











**METHOD OF IDENTIFYING COMBINATION OF ENTITIES AS THERAPEUTIC AGENT****Publication number:** JP2002328124**Publication date:** 2002-11-15**Inventor:** STOCKWELL BRENT R; BORISY ALEXIS; FOLEY MICHAEL A**Applicant:** COMBINATORX INC**Classification:**

**- international:** G01N21/64; A61K45/00; A61P35/00; C12Q1/20; C12Q1/68; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/53; G01N33/58; G01N37/00; G01N21/64; A61K45/00; A61P35/00; C12Q1/18; C12Q1/68; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/53; G01N33/58; G01N37/00; (IPC1-7): G01N21/64; G01N33/15; A61K45/00; A61P35/00; C12Q1/20; C12Q1/68; G01N33/50; G01N33/53; G01N33/58; G01N37/00

**- european:** G01N33/50D2; G01N33/50D2B

**Application number:** JP20010208607 20010709**Priority number(s):** US20000611835 20000707**Also published as:**

 EP1170591 (A2)  
 WO0204946 (A3)  
 WO0204946 (A2)  
 US2006177877 (A1)  
 EP1170591 (A3)  
 CA2352515 (A1)  
 EP1170591 (B1)  
 ES2243367T (T3)  
 DE60111595T (T2)  
 AU780840C (C)  
 AU780840B (B2)

less &lt;&lt;

**Report a data error here****Abstract of JP2002328124**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To systematically execute high-throughput screening for combination of compounds to find the combination having an improved characteristic in a biosystem. **SOLUTION:** This method of screening the combination of two entities or higher degree as to a bioactivity is used a combinatorial array. The method includes (a) a step for providing the entities, (b) a step for preparing the array for the combination of the entities, (c) a step for providing a test element containing one or more of individual biological portions, (d) a step for making the array for the combination of the entities contact with the test element under the condition where contacts between the entities and the test element are surely separated respectively, (e) a step for detecting or measuring the characteristic of the test element, and (f) a step for identifying the combination of the entities generating an action to the characteristic of the test element different from actions of the entities themselves in the combination.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-328124

(P2002-328124A)

(43) 公開日 平成14年11月15日 (2002. 11. 15)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード*(参考)
G 0 1 N 33/15		C 0 1 N 33/15	Z 2 G 0 4 3
A 6 1 K 45/00	Z C C	A 6 1 K 45/00	Z C C 2 G 0 4 3
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/20		C 1 2 Q 1/20	4 C 0 8 4
1/68		1/68	A
審査請求 有 請求項の数63 O L (全 28 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001-208607(P2001-208607)	(71)出願人	501273808 コンビナトアールエックス インコーポレ ーティッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ ストン アルバニー ストリート 650
(22)出願日	平成13年 7 月 9 日(2001. 7. 9)	(74)代理人	100102978 弁理士 清水 初志 (外 1 名)
(31)優先権主張番号	0 9 / 6 1 1, 8 3 5		
(32)優先日	平成12年 7 月 7 日(2000. 7. 7)		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療薬として実体の組み合わせを同定するための方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、生物系において改善された特性を有する組み合わせを発見するための化合物の組み合わせの高スループットスクリーニングを系統的に実施する強力な方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明により、コンビナトリアルアレイを使用して生物活性について2つの実体またはより高次数の組み合わせをスクリーニングする方法が提供された。本発明の方法は、(a) 実体を提供する段階と、(b) 実体の組み合わせのアレイを作製する段階と、(c) 1つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む試験要素を提供する段階と、(d) 実体/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、実体の組み合わせのアレイと試験要素とを接触させる段階と、(e) 試験要素の特性を検出または測定する段階と、(f) 組み合わせの実体自体の作用と異なる試験要素の特性に対する作用を生じる実体の組み合わせを同定する段階とを含む。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 実体の少なくとも49の独自の組み合わせを含む少なくとも7×7のコンビナトリアルアレイにおいて少なくとも7つの実体を使用して生物学的活性について2つの実体またはより高次数の組み合わせをスクリーニングする方法であって、以下の段階を含む方法：

- (a) 該実体を提供する段階；
- (b) 実体の組み合わせの該アレイを作製する段階；
- (c) 1つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む試験要素を提供する段階；
- (d) 実体/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、実体の組み合わせの該アレイに該試験要素を接触させる段階；
- (e) 試験要素の特性を検出または測定する段階；および
- (f) 組み合わせの実体自体の作用とは異なる試験要素の該特性に対する作用を生じる実体の組み合わせを同定する段階。

【請求項2】 段階(b)および(d)が、実体に試験要素を連続的に接触させることによって該試験要素の存在下においてアレイを作製する段階を含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】 試験要素が2つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む、請求項1記載の方法。

【請求項4】 試験要素が生細胞を含む、請求項3記載の方法。

【請求項5】 検出段階(e)がサイトプロットアッセイ法によって実施される、請求項4記載の方法。

【請求項6】 検出段階(e)がレポーター遺伝子アッセイ法によって実施される、請求項4記載の方法。

【請求項7】 検出段階(e)が蛍光共鳴エネルギー移動アッセイ法によって実施される、請求項4記載の方法。

【請求項8】 検出段階(e)が蛍光カルシウム結合指示薬色素を検出することによって実施される、請求項4記載の方法。

【請求項9】 検出段階(e)が蛍光顕微鏡を使用する、請求項4記載の方法。

【請求項10】 段階(e)が発現プロファイリングを使用する、請求項4記載の方法。

【請求項11】 細胞がヒト細胞である、請求項4記載の方法。

【請求項12】 細胞が、癌細胞、免疫細胞、ニューロンおよび線維芽細胞からなる群より選択される、請求項4記載の方法。

【請求項13】 試験要素が、少なくとも2つの生体分子と少なくとも1つのレポーター分子を含む無細胞培地を含む、請求項1記載の方法。

【請求項14】 段階(b)および(d)の一方または両方が、ロボット工学システムを使用して実施される、請求項1記載の方法。

【請求項15】 段階(b)および(d)の一方または両方が

マイクロ流体工学を使用して実施される、請求項1記載の方法。

【請求項16】 段階(b)および(d)の一方または両方がインクジェットプリンター技術を使用して実施される、請求項1記載の方法。

【請求項17】 実体が、化合物、イオンまたは放射線である、請求項1記載の方法。

【請求項18】 化合物が、非ポリマー有機化合物、脂質、炭水化物、ペプチド、無機化合物、およびオリゴヌクレオチドからなる群より選択される、請求項17記載の方法。

【請求項19】 放射線が、可視光線、可視外光線(outside the visible range)、および電離放射線からなる群より選択される、請求項17記載の方法。

【請求項20】 実体の少なくとも1つが精製された形態で使用される化合物である、請求項1記載の方法。

【請求項21】 化合物の各々が精製された形態で使用される、請求項20記載の方法。

【請求項22】 実体が混合物の構成要素として提供される化合物である、請求項1記載の方法。

【請求項23】 混合物が天然産物の抽出物である、請求項22記載の方法。

【請求項24】 作用が相乗作用である、請求項1記載の方法。

【請求項25】 請求項1記載の方法により同定される組み合わせを患者に投与する段階を含む患者を治療する方法。

【請求項26】 請求項1記載の方法により同定される実体の組み合わせ。

【請求項27】 (i) 請求項1記載の方法により同定される実体の組み合わせと、(ii) 薬学的に許容されうる担体とを含む薬学的組成物。

【請求項28】 生物学的活性について2つの実体またはより高次数の組み合わせをスクリーニングする方法であって、以下の段階を含む方法：

- (a) 実体のセットから少なくとも200の独自の2つの実体またはより高次数の組み合わせのアレイを作製する段階；
- (b) 1つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む試験要素を提供する段階；
- (c) 実体/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、実体の組み合わせの該アレイに該試験要素を接触させる段階；
- (d) 試験要素の特性を検出または測定する段階；および
- (e) 組み合わせの実体自体の作用とは異なる試験要素の該特性に対する作用を生じる実体の組み合わせを同定する段階。

【請求項29】 段階(a)～(c)が、実体に試験要素を連続的に接触させることによって該試験要素の存在下においてアレイを作製する段階を含む、請求項28記載の方

法。

【請求項30】 (f)段階(a)～(e)までを少なくとも2回反復する段階をさらに含み、段階(a)において、少なくとも200の組み合わせのアレイが各反復において異なる、請求項28記載の方法。

【請求項31】 段階(f)の少なくとも2回の反復が互いに10日以内に生ずる、請求項30記載の方法。

【請求項32】 アレイが少なくとも400の独自の組み合わせを含む、請求項28記載の方法。

【請求項33】 アレイが少なくとも1540の独自の組み合わせを含む、請求項28記載の方法。

【請求項34】 実体が、化合物、イオン、または放射線である、請求項28記載の方法。

【請求項35】 化合物が、非ポリマー有機化合物、脂質、炭水化物、ペプチド、無機化合物、およびオリゴヌクレオチドからなる群より選択される、請求項34記載の方法。

【請求項36】 放射線が、可視光線、可視外光線、および電離放射線からなる群より選択される、請求項34記載の方法。

【請求項37】 実体の少なくとも1つが精製された形態で使用される化合物である、請求項28記載の方法。

【請求項38】 化合物の各々が精製された形態で使用される、請求項28記載の方法。

【請求項39】 実体が、混合物の構成要素として提供される化合物である、請求項28記載の方法。

【請求項40】 混合物が天然産物の抽出物である、請求項38記載の方法。

【請求項41】 作用が相乗作用である、請求項28記載の方法。

【請求項42】 段階(a)および(c)の一方または両方がロボット工学システムを使用して実施される、請求項28記載の方法。

【請求項43】 段階(a)および(c)の一方または両方がマイクロ流体工学を使用して実施される、請求項28記載の方法。

【請求項44】 段階(a)および(c)の一方または両方がインクジェットプリンター技術を使用して実施される、請求項28記載の方法。

【請求項45】 請求項28記載の方法により同定される組み合わせを患者に投与する段階を含む患者を治療する方法。

【請求項46】 請求項28記載の方法により同定される実体の組み合わせ。

【請求項47】 (i)請求項28記載の方法により同定される実体の組み合わせと、(ii)薬学的に許容されうる担体とを含む薬学的組成物。

【請求項48】 生物学的活性について2つの実体またはより高次数の組み合わせをスクリーニングする方法であって、以下の段階を含む方法：

(a)少なくとも49の独自の2つの実体またはより高次数の組み合わせのアレイを作製する段階；

(b)1つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む試験要素を提供する段階；

(c)実体/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、実体の組み合わせの該アレイに該試験要素を接触させる段階；

(d)試験要素の特性を検出または測定する段階；

(e)組み合わせの実体自体の作用とは異なる試験要素の該特性に対する作用を生じる実体の組み合わせを同定する段階；および

(f)各反復に異なるアレイを使用して、段階(a)～(e)を1週間の期間にわたって少なくとも25回反復する段階。

【請求項49】 段階(a)～(e)が、各反復において異なるアレイを使用して、30日の期間にわたって少なくとも100回反復される、請求項48記載の方法。

【請求項50】 実体が、化合物、イオン、または放射線である、請求項48記載の方法。

【請求項51】 化合物が、非ポリマー有機化合物、脂質、炭水化物、ペプチド、無機化合物およびオリゴヌクレオチドからなる群より選択される、請求項50記載の方法。

【請求項52】 放射線が、可視光線、可視外光線および電離放射線からなる群より選択される、請求項50記載の方法。

【請求項53】 実体が、精製された形態で使用される化合物である、請求項48記載の方法。

【請求項54】 実体が、混合物の構成要素として提供される化合物である、請求項48記載の方法。

【請求項55】 混合物が天然産物の抽出物である、請求項54記載の方法。

【請求項56】 作用が相乗作用である、請求項48記載の方法。

【請求項57】 段階(a)および(c)の一方または両方が、ロボット工学システムを使用して実施される、請求項48記載の方法。

【請求項58】 段階(a)および(c)の一方または両方が、マイクロ流体工学を使用して実施される、請求項48記載の方法。

【請求項59】 段階(a)および(c)の一方または両方が、インクジェットプリンター技術を使用して実施される、請求項48記載の方法。

【請求項60】 生物学的活性について2つの実体またはより高次数の組み合わせをスクリーニングする方法であって、以下の段階を含む方法：

(a)実体のセットから、少なくとも10,000の独自の2つの実体またはより高次数の組み合わせのアレイを作製する段階；

(b)1つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む試験要素を提供する段階；

(c) 実体/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、実体の組み合わせの該アレイに該試験要素を接触させる段階；

(d) 試験要素の特性を検出または測定する段階；

(e) 組み合わせの実体自体の作用とは異なる試験要素の該特性に対する作用を生じる実体の組み合わせを同定する段階；および

(f) 段階(a)～(e)を10日またはそれ以下の期間にわたって少なくとも2回反復する段階であって、段階(a)において、少なくとも10,000の2つの実体の組み合わせの該アレイが2回またはそれ以上の反復において異なる段階。

【請求項61】 生物学的活性について2つの実体またはより高次数の組み合わせをスクリーニングする方法であって、以下の段階を含む方法：

(a) 1つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む試験要素を提供する段階；

(b) 実体/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、少なくとも100の実体を該試験要素に接触させる段階；

(c) 該試験要素の特性を検出または測定する段階；

(d) 該実体と接触させていない該試験要素の該特性と比較して、該特性の変化を生ずる実体を選択する段階；

(e) 同定した実体から、少なくとも49の独自の2つの実体またはより高次数の組み合わせのアレイを作製する段階；

(f) 実体の組み合わせ/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、実体の組み合わせの該アレイに試験要素に接触させる段階；

(g) 段階(f)の試験要素の特性を検出または測定する段階；および

(h) 組み合わせの実体自体の作用と異なる段階(g)の該特性に作用を生ずる実体の組み合わせを同定する段階。

【請求項62】 段階(a)の試験要素が、段階(f)の試験要素と同じである、請求項61記載の方法。

【請求項63】 段階(c)の特性が、段階(g)の特性と同じである、請求項61記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、治療薬として実体の組み合わせを同定するための方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 多数の疾患状態が多数の表現型の変化に関連している。これは長い間、臨床において見られていたが、遺伝学の最近の進歩によって、この観察が分子レベルで確認されている。例えば、癌細胞の発現プロファイルは、多数の体細胞突然変異によって生ずる遺伝子発現における数百の変化を明らかにしている。さらに、ヒト細胞および組織は、それらが重複性および自己緩衝性シグナル伝達系をしばしば含有するように、恒常

性機序を進化させている。細胞状態の変化を生じる天然のシグナルは、1つの標的に送達されずに、標的の適切な組み合わせに送達されることが多い。従って、多数の変数の中程度の変化が、特異性の高い作用を与える。

【0003】 一方、歴史的および技術的理由のために、薬学、化学および生物団体は、生物的影響を生じる1つの個々の分子に焦点を絞っている。歴史的なパラダイムにより、特定のタンパク質に影響を与える有機低分子が同定され、生物および医学の両方において有用な試薬を提供している。これらの分子は、治療的関連を有し、且つ化学的タンパク質ノックアウトとして作用することによってタンパク質の機能の損失を生じることによってシグナル伝達経路を解明する際に有効であるタンパク質の生物機能のプロープとしても有用である。また、これらの低分子と特定の生物標的との相互作用、および特定の生物機能に作用を与える能力によって、それらは治療薬を開発するための候補物としても利用可能である可能性がある。

【0004】 低分子が生物標的と相互作用することは予測が不可能であるので、大多数の有機低分子の形成に懸命な努力が払われている。これらは、このような化合物のいわゆる「ライブラリー」として集められ、適当な望ましい特徴を有する「多種多様なライブラリー (diverse library)」を構築する目標を有している。このような多種多様なライブラリーは、既存の低分子のコレクションから構築されてもよいし、または「コンビナトリアル・ケミストリー (combinatorial chemistry)」を使用して作製されてもよい。これらのライブラリーは、活性分子を同定するのに感受性のあるスクリーニングに関連させることができる (Stocwellら、Chem. Biol. 1999, 6, 71-83)。

【0005】 多くの場合、研究者らは、標的タンパク質と相互作用する能力、またはあるクラスの天然化合物の特定の局面を模倣するように設計される特徴的な構造特徴などの、特定の特徴を全てのメンバーが共有するバイアス (bias) ライブラリーを開発している。例えば、多くのライブラリーは天然ペプチドの1つまたはそれ以上の特徴を模倣するように設計されている。このような「ペプチド模倣物 (peptidomimetic)」ライブラリーは、フタルイミドライブラリー (国際公開公報第97/22594号)、チオフエンライブラリー (国際公開公報第97/40034号)、およびベンゾジアゼピンライブラリー (米国特許第5,288,514号) を含む。天然産物に類似している構造的特徴を有し、且つ小型細胞ベースアッセイ法に適合性である1つのライブラリーが合成されている (Tanら、J. Am. Chem. 1998, 120, 8565)。

【0006】 現代の薬物発見過程は、主に、生物学的過程に対する影響について化合物を迅速にアッセイする能力に基づいて構成されている。製薬産業では、生物学的分子間の相互作用を遮断、低下、または増強する化合物

を同定することに注意が集中している。具体的には、生物系において、受容体とタンパク質リガンドの相互作用はしばしば直接的に、または幾らか下流の事象を介して、その系および結果として治療が求められる患者に対する有害な作用または有用な作用のいずれかを生じる。従って、研究者らは、このような受容体/リガンド相互作用を低下、遮断、または増強する化合物を長い間探索してきた。

【0007】高スループットスクリーニングシステムは、既存の生化学および細胞ベースアッセイ法におけるスループットの実際的な限界を克服するために設計された。有機化合物の従来の合成法および従来の生物学的アッセイ法はかなりの時間と労力と熟練とを要する。最大数の化合物をスクリーニングするには、各スクリーニングに関連する時間を短縮し、労力の必要量を低下することが必要である。

【0008】従って、異なる分子コレクションの高スループットスクリーニングは、新規薬剤を開発するためのリード化合物を探索する際の中心的な役割を果たしている。これらの高スループットスクリーニングのインプットは、既存の化学的に合成された分子から集成された化合物のライブラリー（製薬会社の専売権のあるライブラリー由来など）、天然産物（微生物の発酵培地）およびコンビナトリアル・ケミストリー技術によって作製された新規ライブラリーである（Tanら、J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 8565）。ライブラリーは、リード薬剤候補物として利用可能である、望ましい特性を有する1つの化合物を発見する可能性を増加する数百万の化合物を含む（Tanら、J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 9073-9087）。

【0009】薬剤発見の従来のパラダイムを増強すると、コンビナトリアル・ケミストリーは、スクリーニングに利用可能な化合物の数を劇的に増加させており、およびヒトゲノム研究は、スクリーニングのための大多数の新規分子標的をカバーしていない。スクリーニングは、酵素阻害剤、受容体アゴニスト、またはアンタゴニストを探索する種々の方法においてこれらの新規標的を使用することができる。生物系における1つの重大な相互作用を低下、遮断、または増強する化合物を見出すことが従来の目標であった（Weberら、Angew. Chem. Int. Engl., 1995, 34, 2280-2282）。また、多くの研究者が、スクリーニングを生細胞全体で実施し、スクリーニングの読み出しが細胞の検出可能な特性である表現型に基づいたアッセイ系に適合している（Stockwellら、Chem. Biol. 1999, 6, 71-83; Mayerら、Science, 1999, 286, 971-974）。

【0010】これまでに開発された高スループットスクリーニング方法は、製薬産業の主流である「1-薬剤-1-標的（one-drug-one target）」パラダイムに基づいて設計されてきた。歴史的な理由のため、また通常の考え

方および認識されるリスク因子のため、現代の薬剤発見過程は、主に、薬剤候補物として利用可能であると同時に、1つの活性分子を見出すことを希望している。臨床医は、「1-薬剤-1-標的（one-drug-one target）」方法は、多くの疾患を治療するのに十分でないと長い間認識してきた。臨床医は、同じ状態を治療する、または明確な論理的関連を有する薬剤の明らかな組み合わせを試験してきた。例えば、HIV治療および化学療法において、多数の活性な薬剤の組み合わせが必要となった。常に最も有望な薬剤の1つは組み合わせであり、閉経後の女性の複雑な変化を治療するために使用されるプレマリン（Premarin）は、22を超える別個で重要な成分を含む。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、コンビナトリアルアレイを使用して生物活性について2つの実体またはより高次数の組み合わせをスクリーニングする方法を提供することを課題とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、生物系を乱す強力な新規方法を発明した。これは、生物系において相乗的に相互作用する組み合わせを発見するために、化合物の組み合わせ、すなわち、混合物または非化学的結合した組み合わせの高スループットスクリーニングを系統的に実施することを含む。本発明の方法は、組み合わせの各化合物が以前には生物作用を認識されていない場合でも、または化合物および組み合わせが先験的に組み合わせで使用する明らかな候補でなかった場合でも、以前には未知の治療的な作用を示す化合物の効果的な治療的組み合わせを同定することができる。

【0013】従って、一局面において、本発明は、実体の少なくとも49の独自の組み合わせを含む少なくとも7×7のコンビナトリアルアレイにおいて、少なくとも7つの実体を使用して、生物活性について2つの実体またはより高次数の組み合わせをスクリーニングする方法を提供する。本発明の方法は、(a)実体を提供する段階と、(b)実体の組み合わせのアレイを作製する段階と、(c)1つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む試験要素化合物を提供する段階と、(d)実体/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、実体の組み合わせのアレイに試験要素を接触させる段階と、(e)試験要素の特性を検出または測定する段階と、(f)組み合わせの実体自体の作用とは異なる試験要素に対する作用を生じる実体の組み合わせを同定する段階とを含む。

【0014】第二の関連する局面において、本発明は、生物活性について2つの実体またはより高次数の組み合わせをスクリーニングする方法を特徴とする。本発明の方法は、(a)2つまたはそれ以上の実体から少なくとも20の独自の組み合わせのアレイを作製する段階と、(b)1つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む試験要素を提供する段階と、(c)実体/試験要素の各接触が互いに



確実に隔離される条件下において、実体の組み合わせのアレイに試験要素を接触させる段階と、(d)試験要素の特性を検出または測定する段階と、(e)組み合わせの実体自体の作用とは異なる試験要素に対する作用を生じる実体の組み合わせを同定する段階とを含む。このアッセイ法の構成要素は、第一のアッセイ法に関連して上記のように変更されうる。好ましい態様において、本発明の方法は、(f)段階(a)～(e)までを少なくとも2回反復する段階をさらに含み、段階(a)において、少なくとも200の組み合わせのアレイが各反復において異なっている。他の好ましい態様において、アレイは少なくとも400～1540の独自の組み合わせを含む。段階(f)の2回の反復を実施する場合、好ましくは、それらは互いに10日以内に生ずる。

【0015】第三の関連する局面において、本発明は、生物活性について2つの実体またはより高次数の組み合わせをスクリーニングする方法を特徴とする。本発明の方法は、(a)少なくとも49の独自の2つ以上の実体の組み合わせのアレイを作製する段階と、(b)1つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む試験要素を提供する段階と、(c)実体/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、実体の組み合わせのアレイに試験要素を接触させる段階と、(d)試験要素の特性を検出または測定する段階と、(e)組み合わせの実体自体の作用とは異なる試験要素に対する作用を生じる実体の組み合わせを同定する段階と、(f)各反復に異なるアレイを使用して、段階(a)～(e)を1週間の期間にわたって少なくとも25回反復する段階とを含む。このアッセイ法の構成要素は、先に記載したアッセイ法について上記のように変更されうる。

【0016】第四の関連する局面において、本発明は、生物活性について2つの実体またはより高次数の組み合わせをスクリーニングする方法を特徴とする。本発明の方法は、(a)少なくとも49の独自の2つ以上の実体の組み合わせのアレイを作製する段階と、(b)1つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む試験要素を提供する段階と、(c)実体/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、実体の組み合わせのアレイに試験要素を接触させる段階と、(d)試験要素の特性を検出または測定する段階と、(e)組み合わせの実体自体の作用とは異なる試験要素に対する作用を生じる実体の組み合わせを同定する段階と、(f)各反復に異なるアレイを使用して、段階(a)～(e)を1ヶ月の期間にわたって少なくとも100回反復する段階とを含む。このアッセイ法の化合物は、先に記載のアッセイ法のように変更されうる。

【0017】第五の局面において、本発明は、生物活性について2つの実体またはより高次数の組み合わせをスクリーニングする方法を特徴とする。本発明の方法は、(a)実体のセットから、少なくとも10,000の独自の2つの実体またはより高次数の組み合わせのアレイを作製する

段階と、(b)1つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む試験要素を提供する段階と、(c)実体/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、実体の組み合わせのアレイに試験要素を接触させる段階と、(d)試験要素の特性を検出または測定する段階と、(e)組み合わせの実体自体の作用とは異なる試験要素の特性に対する作用を生じる実体の組み合わせを同定する段階と、(f)段階(a)～(e)を10日またはそれ以下の期間にわたって少なくとも2回反復する段階であって、段階(a)において、少なくとも10,000の2つの実体の組み合わせのアレイが2回またはそれ以上の反復において異なる段階とを含む。

【0018】第六の局面において、生物活性について実体の組み合わせをスクリーニングする方法を特徴とする。本発明の方法は、(a)1つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む試験要素を提供する段階と、(b)実体/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、少なくとも100の実体を試験要素に接触させる段階と、(c)試験要素の特性を検出または測定する段階と、(d)実体と接触させていない試験要素の特性と比較して、特性の変化を生ずる実体を選択する段階と、(e)同定した実体から、少なくとも49の独自の2つの実体またはより高次数の組み合わせのアレイを作製する段階と、(f)実体の組み合わせ/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、実体の組み合わせのアレイに試験要素を接触させる段階と、(g)段階(f)の試験要素の特性を検出または測定する段階と、(h)組み合わせの実体自体の作用と異なる段階(g)の特性に作用を生ずる実体の組み合わせを同定する段階とを含む。好ましくは、段階(a)の試験要素は段階(f)の試験要素と同一であるが、各段階において異なる試験要素を使用することが望ましい場合もある（例えば、段階(a)における培養細胞および段階(f)における動物全体）。同様に、段階(c)の特性は、好ましくは、段階(g)の試験要素と同一であるが、各段階において異なる特性を使用することが望ましい場合もある。

【0019】アッセイ法の全てについて、サイトプロットアッセイ法、レポーター遺伝子アッセイ法、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)アッセイ法、蛍光カルシウム結合指示薬色素、蛍光顕微鏡、または発現プロファイリングを含む数多くの活性読み出し技術を使用することができる。アッセイ法は、好ましくは、ロボット工学システムおよび384および1536ウェルプレートを使用して自動化される。アッセイ法はまた、過程の一部または全てがマイクロ流体工学を使用して実施することができるように構成されうる。または、アッセイ法は、熟練した科学者および効率的なライン工程を使用することによって実施することができる。

【0020】本発明に係る組み合わせで試験される好ましい実体は、化合物（例えば、非ポリマー有機化合物、

特に、低分子；脂質；炭水化物；ペプチド；無機化合物；およびDNAおよびRNA分子を含むオリゴヌクレオチド、イオン（例えば、金属イオン）および放射線（例えば、可視光線、可視外光線(outside the visible range)、マイクロ波放射線、赤外線またはx線およびγ線などの電離放射線）である。組み合わせで試験される実体が化合物である場合には、それらは、好ましくは、精製された形態であるが、例えば天然産物の抽出物のような混合物の構成要素として提供されてもよい。例えば、サブセット（1つまたはそれ以上の化合物）が精製された形態であって、化合物の各々が精製された形態で使用されてもよい。好ましくは、実体/試験要素の各接触は、200μL未満、より好ましくは100μL未満、最も好ましくは50μLまたは25μL未満の容量中で実施される。ある種の状況では、10μL程度の容量または500nLもしくはそれ未満の少容量を使用することができる。また、化合物は、好ましくは、100μL未満、より好ましくは1μL未満、最も好ましくは100nLまたは50nL未満の少容量である。当業者は、さらに少量の容量（例えば、10 nLまたは1 nL）を使用することができることを認識すると思われる。

【0021】好ましい試験要素は、ニューロン、線維芽細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、グリア細胞、胎性幹細胞、造血幹細胞、肥満細胞、脂肪細胞、原生動物細胞、細菌細胞、酵母細胞、神経幹細胞、ならびにT細胞およびB細胞を含む免疫細胞などの細胞全体（例えば、形質転換細胞または非形質転換細胞）；細胞塊；組織；動物；および再構成無細胞培地であり、ある場合には、試験要素は、タンパク質またはオリゴヌクレオチドなどの生物学的に関連のある1分子を含んでもよい。

【0022】試験要素に対して望ましい組み合わせによって示される作用は、好ましくは、DNA合成の増加または低下などの、試験要素の特性に対する相乗作用である。または、組み合わせは、性質が補助的であってもよいが、副作用はより少なく、または1つの実体は他方に対して負の有用な作用を発揮してもよく、例えば一方の化合物は別の化合物の毒性を中和する。

【0023】実体は任意の配列で試験要素と接触させることができ、すなわち1つの実体を試験要素に添加することができ、その後1つの第二の実体を添加するか、または代替的には複数の第二の実体を組み合わせることから、試験要素と接触させることができる。

【0024】本発明の高スループットスクリーニング方法は、製薬産業で使用される従来の薬剤発見方法の迅速で、強力な別法となる。本発明は、例えば低分子（そのいくつかは新規に合成してもよく、またはそのいくつかは既知のFDA承認済み薬剤であってもよい）の以前には知られていなかった治療的に強力な組み合わせを同定することができる。効果的な組み合わせが、全てがすでにFDAの承認を得ている2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の

薬剤によってのみより作製される場合には、新たな組み合わせは、FDA承認過程を介して容易に移動するさらなる利点を有する。

【0025】本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになる。

【0026】定義

「コンビナトリアル・ケミストリーライブラリー」：本明細書において使用される、「コンビナトリアル・ケミストリーライブラリー」とは、足場構造の多様化の各段階において異なる試薬を使用することによって、好ましくは、多様化可能な足場構造から合成される天然産物と類似している複数の複合分子である。

【0027】「多様性ライブラリー (diverse library)」：本明細書において使用される、「多様性ライブラリー」とは、既存の化学的に合成された分子（製薬会社の専売権のあるライブラリー由来など）と、天然産物（微生物の発酵培地）と、コンビナトリアル・ケミストリー技術によって作製される新規ライブラリーとを含む、多数の可能性のある起源から集成された複数の複合分子である。

【0028】「多様化可能な足場構造」：本明細書において使用される、「多様化可能な足場構造」とは、合成試薬とさらに反応して、少なくとも1つの新たな官能基を形成することができる潜在的官能基または活性な官能基を含有する、鑄型構造から合成される化合物である。本明細書において使用される、「潜在的な (latent) 官能基」とは、存在しているが一時的に不活性であるものである。活性化試薬により放出されると、潜在的な官能基は活性になり、さらなる多様化に利用することができる。

【0029】「試験要素」：本明細書において使用される「試験要素」とは、実体の組み合わせを接触させ、次いで実体の作用について観察される系である。試験要素は、好ましくは、細胞の内部に2つまたはそれ以上の生物学的部分を含む。

【0030】「化合物プリンティング」：本明細書において使用される「化合物プリンティング」とは、cDNAマイクロアレイ法に使用されるものなどの高精度ロボットを使用して表面（例えば、ガラス）に化合物を適用することを意味する (J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 7967~7968)。化合物は直径が250ミクロンまたはそれ以下であってもよく、化合物は、共有結合により結合されても、または静電的相互作用または疎水性相互作用を介して表面に接着されてもよい。

【0031】「マイクロ流体工学」：本明細書において使用される、「マイクロ流体工学」装置は、従来のフォトリソグラフィー (photolithography)（例えば、Caliper Technologies, Mountain View, CA; <http://www.calipertech.com>）または従来の方法（例えば、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1998, 37, 550~575のソフ



トリソグラフィーなど)を含む、任意のフォトリソグラフィー方法によって作製される溝形構造である。

【0032】「インクジェット」：本明細書において使用される「インクジェット」技術は、小容量の液体を送達するための熱インクジェットおよび圧電スプレー技法を意味する。

【0033】「低分子」：本明細書において使用される「低分子」とは、実験室において合成される、または天然に見出される有機化合物を意味する。典型的には、低分子は、いくつかの炭素-炭素結合を含有し、1500g/mol未満の分子量を有するという点で特徴づけられるが、この特徴は本明細書の目的を限定する意図のものではない。天然に存在する「低分子」の例には、タキソール、ダイネマイシン(dynemicin)およびラバマイシンが挙げられるが、それらに限定されることはない。

【0034】本発明に係る方法においては、(1)実体の少なくとも49の独自の組み合わせを含む少なくとも7×7のコンビナトリアルアレイにおいて少なくとも7つの実体を使用して生物学的活性について2つの実体またはより高次数の組み合わせをスクリーニングする方法であって、(a)該実体を提供する段階；(b)実体の組み合わせの該アレイを作製する段階；(c)1つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む試験要素を提供する段階；(d)実体/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、実体の組み合わせの該アレイに該試験要素を接触させる段階；(e)試験要素の特性を検出または測定する段階；および(f)組み合わせの実体自体の作用とは異なる試験要素の該特性に対する作用を生じる実体の組み合わせを同定する段階を含む方法であることを特徴とする。

【0035】また、本発明に係る方法においては、(2)段階(b)および(d)が、実体に試験要素を連続的に接触させることによって該試験要素の存在下においてアレイを作製する段階を含む、上記(1)記載の方法であることを特徴とする。

【0036】また、本発明に係る方法においては、(3)試験要素が2つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む、上記(1)記載の方法であることを特徴とする。

【0037】また、本発明に係る方法においては、(4)試験要素が生細胞を含む、上記(3)記載の方法であることを特徴とする。

【0038】また、本発明に係る方法においては、(5)検出段階(e)がサイトプロットアッセイ法によって実施される、上記(4)記載の方法であることを特徴とする。

【0039】また、本発明に係る方法においては、(6)検出段階(e)がレポーター遺伝子アッセイ法によって実施される、上記(4)記載の方法であることを特徴とする。

【0040】また、本発明に係る方法においては、

(7)検出段階(e)が蛍光共鳴エネルギー移動アッセイ法によって実施される、上記(4)記載の方法であることを特徴とする。

【0041】また、本発明に係る方法においては、

(8)検出段階(e)が蛍光カルシウム結合指示薬色素を検出することによって実施される、上記(4)記載の方法であることを特徴とする。

【0042】また、本発明に係る方法においては、

(9)検出段階(e)が蛍光顕微鏡を使用する、上記(4)記載の方法であることを特徴とする。

【0043】また、本発明に係る方法においては、(10)段階(e)が発現プロファイリングを使用する、上記(4)記載の方法であることを特徴とする。

【0044】また、本発明に係る方法においては、(11)細胞がヒト細胞である、上記(4)記載の方法であることを特徴とする。

【0045】また、本発明に係る方法においては、(12)細胞が、癌細胞、免疫細胞、ニューロンおよび線維芽細胞からなる群より選択される、上記(4)記載の方法であることを特徴とする。

【0046】また、本発明に係る方法においては、(13)試験要素が、少なくとも2つの生体分子と少なくとも1つのレポーター分子を含む無細胞培地を含む、上記(1)記載の方法であることを特徴とする。

【0047】また、本発明に係る方法においては、(14)段階(b)および(d)の一方または両方が、ロボット工学システムを使用して実施される、上記(1)記載の方法であることを特徴とする。

【0048】また、本発明に係る方法においては、(15)段階(b)および(d)の一方または両方がマイクロ流体工学を使用して実施される、上記(1)記載の方法であることを特徴とする。

【0049】また、本発明に係る方法においては、(16)段階(b)および(d)の一方または両方がインクジェットプリンター技術を使用して実施される、上記(1)記載の方法であることを特徴とする。

【0050】また、本発明に係る方法においては、(17)実体が、化合物、イオンまたは放射線である、上記(1)記載の方法であることを特徴とする。

【0051】また、本発明に係る方法においては、(18)化合物が、非ポリマー有機化合物、脂質、炭水化物、ペプチド、無機化合物、およびオリゴヌクレオチドからなる群より選択される、上記(17)記載の方法であることを特徴とする。

【0052】また、本発明に係る方法においては、(19)放射線が、可視光線、可視外光線、および電離放射線からなる群より選択される、上記(17)記載の方法であることを特徴とする。

【0053】また、本発明に係る方法においては、(2

0) 実体の少なくとも1つが精製された形態で使用される化合物である、上記(1)記載の方法であることを特徴とする。

【0054】また、本発明に係る方法においては、(21) 化合物の各々が精製された形態で使用される、上記(20)記載の方法であることを特徴とする。

【0055】また、本発明に係る方法においては、(22) 実体が混合物の構成要素として提供される化合物である、上記(1)記載の方法であることを特徴とする。

【0056】また、本発明に係る方法においては、(23) 混合物が天然産物の抽出物である、上記(22)記載の方法であることを特徴とする。

【0057】また、本発明に係る方法においては、(24) 作用が相乗作用である、上記(1)記載の方法であることを特徴とする。

【0058】また、本発明に係る方法においては、(25) 上記(1)記載の方法により同定される組み合わせを患者に投与する段階を含む患者を治療する方法であることを特徴とする。

【0059】また、本発明に係る組み合わせにおいては、(26) 上記(1)記載の方法により同定される実体の組み合わせであることを特徴とする。

【0060】また、本発明に係る薬学的組成物においては、(27) (i) 上記(1)記載の方法により同定される実体の組み合わせと、(ii) 薬学的に許容されうる担体とを含む薬学的組成物であることを特徴とする。

【0061】また、本発明に係る方法においては、(28) 生物学的活性について2つの実体またはより高次数の組み合わせをスクリーニングする方法であって、(a) 実体のセットから少なくとも200の独自の2つの実体またはより高次数の組み合わせのアレイを作製する段階；(b) 1つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む試験要素を提供する段階；(c) 実体/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、実体の組み合わせの該アレイに該試験要素を接触させる段階；(d) 試験要素の特性を検出または測定する段階；および(e) 組み合わせの実体自体の作用とは異なる試験要素の該特性に対する作用を生じる実体の組み合わせを同定する段階を含む方法であることを特徴とする。

【0062】また、本発明に係る方法においては、(29) 段階(a)～(c)が、実体に試験要素を連続的に接触させることによって該試験要素の存在下においてアレイを作製する段階を含む、上記(28)記載の方法であることを特徴とする。

【0063】また、本発明に係る方法においては、(30) (f) 段階(a)～(e)までを少なくとも2回反復する段階をさらに含み、段階(a)において、少なくとも200の組み合わせのアレイが各反復において異なる、上記(28)記載の方法であることを特徴とする。

【0064】また、本発明に係る方法においては、(3

1) 段階(f)の少なくとも2回の反復が互いに10日以内に生ずる、上記(30)記載の方法であることを特徴とする。

【0065】また、本発明に係る方法においては、(32) アレイが少なくとも400の独自の組み合わせを含む、上記(28)記載の方法であることを特徴とする。

【0066】また、本発明に係る方法においては、(33) アレイが少なくとも1540の独自の組み合わせを含む、上記(28)記載の方法であることを特徴とする。

【0067】また、本発明に係る方法においては、(34) 実体が、化合物、イオン、または放射線である、上記(28)記載の方法であることを特徴とする。

【0068】また、本発明に係る方法においては、(35) 化合物が、非ポリマー有機化合物、脂質、炭水化物、ペプチド、無機化合物、およびオリゴヌクレオチドからなる群より選択される、上記(34)記載の方法であることを特徴とする。

【0069】また、本発明に係る方法においては、(36) 放射線が、可視光線、可視外光線、および電離放射線からなる群より選択される、上記(34)記載の方法であることを特徴とする。

【0070】また、本発明に係る方法においては、(37) 実体の少なくとも1つが精製された形態で使用される化合物である、上記(28)記載の方法であることを特徴とする。

【0071】また、本発明に係る方法においては、(38) 化合物の各々が精製された形態で使用される、上記(28)記載の方法であることを特徴とする。

【0072】また、本発明に係る方法においては、(39) 実体が、混合物の構成要素として提供される化合物である、上記(28)記載の方法であることを特徴とする。

【0073】また、本発明に係る方法においては、(40) 混合物が天然産物の抽出物である、上記(38)記載の方法であることを特徴とする。

【0074】また、本発明に係る方法においては、(41) 作用が相乗作用である、上記(28)記載の方法であることを特徴とする。

【0075】また、本発明に係る方法においては、(42) 段階(a)および(c)の一方または両方がロボット工学システムを使用して実施される、上記(28)記載の方法であることを特徴とする。

【0076】また、本発明に係る方法においては、(43) 段階(a)および(c)の一方または両方がマイクロ流体工学を使用して実施される、上記(28)記載の方法であることを特徴とする。

【0077】また、本発明に係る方法においては、(44) 段階(a)および(c)の一方または両方がインクジェットプリンター技術を使用して実施される、上記(28)記載の方法であることを特徴とする。

【0078】また、本発明に係る方法においては、(45) 上記(28)記載の方法により同定される組み合わせを

患者に投与する段階を含む患者を治療する方法であることを特徴とする。

【0079】また、本発明に係る組み合わせにおいては、(46)上記(28)記載の方法により同定される実体の組み合わせであることを特徴とする。

【0080】また、本発明に係る薬学的組成物においては、(47)(i)上記(28)記載の方法により同定される実体の組み合わせと、(ii)薬学的に許容されうる担体とを含む薬学的組成物であることを特徴とする。

【0081】また、本発明に係る方法においては、(48)生物学的活性について2つの実体またはより高次数の組み合わせをスクリーニングする方法であって、(a)少なくとも49の独自の2つの実体またはより高次数の組み合わせのアレイを作製する段階；(b)1つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む試験要素を提供する段階；(c)実体/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、実体の組み合わせの該アレイに該試験要素を接触させる段階；(d)試験要素の特性を検出または測定する段階；(e)組み合わせの実体自体の作用とは異なる試験要素の該特性に対する作用を生じる実体の組み合わせを同定する段階；および(f)各反復に異なるアレイを使用して、段階(a)～(e)を1週間の期間にわたって少なくとも25回反復する段階を含む方法であることを特徴とする。

【0082】また、本発明に係る方法においては、(49)段階(a)～(e)が、各反復において異なるアレイを使用して、30日の期間にわたって少なくとも100回反復される、上記(48)記載の方法であることを特徴とする。

【0083】また、本発明に係る方法においては、(50)実体が、化合物、イオン、または放射線である、上記(48)記載の方法であることを特徴とする。

【0084】また、本発明に係る方法においては、(51)化合物が、非ポリマー有機化合物、脂質、炭水化物、ペプチド、無機化合物およびオリゴヌクレオチドからなる群より選択される、上記(50)記載の方法であることを特徴とする。

【0085】また、本発明に係る方法においては、(52)放射線が、可視光線、可視外光線および電離放射線からなる群より選択される、上記(50)記載の方法であることを特徴とする。

【0086】また、本発明に係る方法においては、(53)実体が、精製された形態で 사용되는化合物である、上記(48)記載の方法であることを特徴とする。

【0087】また、本発明に係る方法においては、(54)実体が、混合物の構成要素として提供される化合物である、上記(48)記載の方法であることを特徴とする。

【0088】また、本発明に係る方法においては、(55)混合物が天然産物の抽出物である、上記(54)記載の方法であることを特徴とする。

【0089】また、本発明に係る方法においては、(5

6)作用が相乗作用である、上記(48)記載の方法であることを特徴とする。

【0090】また、本発明に係る方法においては、(57)段階(a)および(c)の一方または両方が、ロボット工学システムを使用して実施される、上記(48)記載の方法であることを特徴とする。

【0091】また、本発明に係る方法においては、(58)段階(a)および(c)の一方または両方が、マイクロ流体工学を使用して実施される、上記(48)記載の方法であることを特徴とする。

【0092】また、本発明に係る方法においては、(59)段階(a)および(c)の一方または両方が、インクジェットプリンター技術を使用して実施される、上記(48)記載の方法であることを特徴とする。

【0093】また、本発明に係る方法においては、(60)生物学的活性について2つの実体またはより高次数の組み合わせをスクリーニングする方法であって、(a)実体のセットから、少なくとも10,000の独自の2つの実体またはより高次数の組み合わせのアレイを作製する段階；(b)1つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む試験要素を提供する段階；(c)実体/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、実体の組み合わせの該アレイに該試験要素を接触させる段階；(d)試験要素の特性を検出または測定する段階；(e)組み合わせの実体自体の作用とは異なる試験要素の該特性に対する作用を生じる実体の組み合わせを同定する段階；および(f)段階(a)～(e)を10日またはそれ以下の期間にわたって少なくとも2回反復する段階であって、段階(a)において、少なくとも10,000の2つの実体の組み合わせの該アレイが2回またはそれ以上の反復において異なる段階を含む方法であることを特徴とする。

【0094】また、本発明に係る方法においては、(61)生物学的活性について2つの実体またはより高次数の組み合わせをスクリーニングする方法であって、(a)1つまたはそれ以上の別個の生物学的部分を含む試験要素を提供する段階；(b)実体/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、少なくとも100の実体を該試験要素に接触させる段階；(c)該試験要素の特性を検出または測定する段階；(d)該実体と接触させていない該試験要素の該特性と比較して、該特性の変化を生ずる実体を選択する段階；(e)同定した実体から、少なくとも49の独自の2つの実体またはより高次数の組み合わせのアレイを作製する段階；(f)実体の組み合わせ/試験要素の各接触が互いに確実に隔離される条件下において、実体の組み合わせの該アレイに試験要素に接触させる段階；(g)段階(f)の試験要素の特性を検出または測定する段階；および(h)組み合わせの実体自体の作用と異なる段階(g)の該特性に作用を生ずる実体の組み合わせを同定する段階を含む方法であることを特徴とする。

【0095】また、本発明に係る方法においては、(62)段階(a)の試験要素が、段階(f)の試験要素と同じである、上記(61)記載の方法であることを特徴とする。

【0096】また、本発明に係る方法においては、(63)段階(c)の特性が、段階(g)の特性と同じである、上記(61)記載の方法であることを特徴とする。

【0097】

【発明の実施の形態】本発明は、独自の組み合わせにおいてのみ存在する分子の作用を同定するための関連する生物学的アッセイ法を使用して、高スループットスクリーニング系において2-、3-、4-およびより高次数の組み合わせの個々の分子のライブラリーを組み合わせる方法を提供する。このような組み合わせは、別の生物系を探り、検討するために使用することができ、直接的な生物用途を有する可能性があり、新規なヒト治療薬またはヒトにおける他の用途のための活性分子として利用可能である可能性がある。これらの組み合わせは、成長、受精、成熟、または動物または植物を含む、特定の農業産物に特徴的な他のことを促進するために有用となりうる。それらは、化粧製品、香水、食品保存剤、または栄養補助食品を製造する際に有用となりうる。従って、本発明は、生物系において改善された特性を有する組み合わせを発見するための化合物の組み合わせの高スループットスクリーニングを系統的に実施する強力な方法を提供する。

【0098】本発明者らは、多数の分子標的と相互作用する多数の活性剤を含有する場合には、ヒト細胞および組織などの複雑な系と相互作用する薬剤は極めて効果的である可能性があるとして仮定する。薬剤がどのように作動するかについてのこの理解により、それらがどのように設計され、開発されるかの新規な方法の基礎の1つが形成される。この新規な方法は、多数の現行の治療法に劇的な改善を生じ、現在の難治性の疾患、特に多数の変数の中程度の変化を必要とする疾患に対して効果的な治療法を提供することを約束する。

【0099】製薬産業の現在の主流のパラダイムは、1薬剤を1標的に対して設計するものである。本発明者らの方法では、新規世代の薬剤の系統的な開発のためのフレームワークの中心として多変数設計要件の理解が使用される。

【0100】組み合わせで試験される実体

上記のように、多種多様な実体を、本発明に係る組み合わせで試験することができる。これらは、本明細書において詳細に考察される。

【0101】

化合物およびイオン

本発明によりスクリーニングされる一般的なクラスの化合物は有機低分子である。化合物は、合成または天然型（例えば、プロスタグランジン、レクチン、天然型二次代謝物、ホルモン等）であってもよい。精製された形態

のこのような分子の巨大ライブラリーは、製薬会社、化学会社、および学術研究所において入手可能であり、このようなライブラリーは既知のコンビナトリアル・ケミストリー技術を使用して合成してもよい。化合物は既知の生物活性を有しても、有さなくてもよい。本発明の化合物およびコンビナトリアルライブラリーは、例えば、シキミ酸系エポキシオール銑型またはピリジン系銑型イソニコチンアミドから合成される多様化可能な足場から形成される化合物およびライブラリーのような、多様化可能な固体支持体に結合した足場から合成することができる。有機低分子以外に、本発明に係る組み合わせでスクリーニングすることができる他の分子には、オリゴヌクレオチド（DNAおよびRNA）；ポリペプチド（抗体、酵素、受容体、リガンド、構造タンパク質、ヒトタンパク質の変異類似体、およびペプチドホルモン）；脂質；炭水化物および多糖類を含む生体高分子が含まれる。無機分子も、例えば銅、鉄、銀、亜鉛、マグネシウム、マンガ、カルシウム、および金イオンのような金属イオンなどの生物活性である可能性を有しているイオンと同様にスクリーニングすることができる。

【0102】他の実体

生物系に作用を与えると思われる他の非化学的実体も、上記のように、他の化学的実体または化学的実体と組み合わせで本発明によりスクリーニングすることができる。スクリーニングすることができる非化学的実体には光線（可視光線および例えば、赤外線および紫外線のような可視外光線）、x線および $\gamma$ 線などの電離放射線；高圧；高温もしくは低温または高pHもしくは低pH；酸素、窒素、二酸化炭素などのガス状物質；および任意の周波数の音響振動（音波）が含まれる。

【0103】試験要素

組み合わせの作用を検出するために使用される生物アッセイ法は、ほとんどの場合に多数の構成要素を含む。いくつかのアッセイ法において、試験要素は、特にアッセイ法が表現型に基づいたアッセイ法である場合には、細胞全体である。このような細胞全体のアッセイ法は、多変量の治療化合物の有効性の基礎を形成する可能性のある複雑な分子的相互作用の完全なセットを提供する。他のアッセイ法は、多くの望ましい複合体系を含有し、アッセイされる可能な組み合わせの作用に基づくいくつかのレポーター作用を含んでもよい再構成された無細胞培地を使用する。他のアッセイ法は、細胞塊などのより高次数の生物系および多変量コンビナトリアルスクリーニングの動物モデルを使用する。

【0104】個々の化合物のアッセイ法に有用な任意の生物アッセイ法は、本発明のコンビナトリアルスクリーニングに容易に適合される。アッセイ測定には、例えば、細胞膜を貫通する化合物の輸送、電位、活動電位発生、細胞増殖、細胞死、細胞特異化、細胞分化、細胞遊走、遺伝子発現、またはタンパク質レベル（例えば、mR

NA、タンパク質、またはレポーター遺伝子を検出することによって測定される)、酵素活性、リン酸化、メチル化、アセチル化、細胞核へのタンパク質の移行(またはタンパク質の位置の他の変化)、病原菌(例えば、ウイルスまたは細菌)に抵抗する能力、ならびに免疫応答を形成する能力が含まれてもよい。生物全体のアッセイ法では、動物の挙動がレポーターとして利用可能である。

【0105】一例において、アッセイ法は非破壊的アッセイ法である(例えば、化合物の作用の測定が、細胞を害することなく得られうる細胞ベースのアッセイ法)。このようなアッセイ法により、ウェルあたり多数の組み合わせの多数の濃度についてのアッセイ法を実施することができる。例えば、化合物Aを、濃度を増加させながらウェルに添加し、化合物の各添加後に測定を実施する。化合物Aが望ましい濃度に到達したら(化合物の望ましいアッセイ応答または既知の特性(例えば、毒性、溶解度)に基づいて測定)、化合物Bを、濃度を増加させながら添加し、各添加後にアッセイ測定を実施する。この過程を1つのウェルで多数回繰り返し、1つのプレートで数百、数千、または数百万回のアッセイ法を実施することができる。

【0106】組み合わせにおいて考えられる副作用を同定するためには、比較アッセイ法を実施することが望ましい場合がある。例えば、腫瘍細胞を死滅させるか、または腫瘍細胞の増殖を低下させる能力についてスクリーニングされる化合物の組み合わせは、正常な非腫瘍細胞に対する作用についても同時にスクリーニングすることができる。腫瘍細胞に対して望ましい活性を示し、正常な細胞にほとんどまたは全く作用を与えない化合物の組み合わせが、好ましい組み合わせである。正常な細胞に望ましくない作用を与えらると思われる組み合わせはあまり好ましくない。しかし、これらの後者の組み合わせ(または、同様の構造を有する化合物の組み合わせ)は異なる濃度では有効である場合があり、別の検討から必ずしも排除されるべきではない。

【0107】タンパク質、炭水化物、および脂質などの複雑な生体分子を含有する無細胞培地は、例えば、哺乳類、カエル、酵母、もしくは細菌細胞を溶菌して細胞全体の溶解物を提供することによって、またはこのような細胞溶解物から特定の分画を精製することによって、または市販のウサギ網状赤血球溶解物(インビトロにおける転写および/または翻訳反応を実施するために通常使用される)を使用することによって、または哺乳類、酵母、もしくは細菌細胞から下層を形成する細胞を溶解することなく、培養上清を回収することによる既知の方法により作製される。

【0108】サイトプロットアッセイ法  
活性を検出する一方法はサイトプロットアッセイ法である。この方法では、細胞をアッセイプレートのウェルに播種する。細胞は、好ましくは、接着細胞であり、その

結果、それらはウェルの底部に接着して増殖する。上記の方法を使用して、化合物を添加する。例えば、サイトプロットは、BrdUの取り込みを測定することによって増殖を検出するために実施することができる。この例では、細胞をある期間の間インキュベーションする(例えば、4〜72時間)。次いで、例えばロボット液体移動装置または16もしくは8チャネルワンドを使用して培地を吸引する。70%エタノールおよびリン酸緩衝食塩水(PBS)を添加して4℃にて1時間細胞を固定する。固定液を除去し、PBSで1回細胞を洗浄する。PBS洗浄後、0.5% Tween 20を含む2N HClを各ウェルに添加して20分インキュベーションする。HClを、10容量%の2N NaOHを含有するハンクスの平衡塩類溶液(HBSS)の溶液で中和する。この溶液を除去し、細胞をHBSSで2回洗浄し、次いで0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)および0.1% Tween 20を含有するPBSで1回洗浄する。洗浄液を除去し、抗BrdU抗体を、0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)および0.1% Tween 20を含有するPBS溶液を溶媒とする0.5μg/mLマウス抗BrdU抗体として添加する。この抗体溶液はまた、マウスIg抗体(例えば、マウス抗BrdU抗体)を認識する二次抗体(2000倍希釈)も含有する。この二次抗体を酵素である西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)に結合する。1時間のインキュベーション後、抗体溶液を除去し、細胞をPBSで2回洗浄する。2回目のPBS洗浄後、HRP基質(ルミノールを含有する)、過酸化水素、およびパラ-ヨードフェノールなどのエンハンサーを各ウェルに添加する。次いで、各ウェルの光線の量を、フィルムへの露出(プレートの上面にフィルム片を配置することによって)、または標準的な状態(例えば、ウェルあたり0.3秒の露出)を使用してルミノメーターもしくは発光プレートリーダーを使用して各ウェルの発光量を読むことによって検出する。各ウェルからの光線の出力量は、ウェル内で生じたDNA合成量を示す。薬剤の望ましい組み合わせは、対照と比較した場合に、光線の出力が増加または低下するものである。例えば、光線の出力を低下する組み合わせは、DNA合成速度を低下すると思われ、従って、腫瘍細胞の増殖を阻止または抑制する際に有効となりうる。または、光線の出力の増加はDNA合成の増加を示す。例えば、200×1コンビナトリアルアレイにおいて初代細胞を使用してもよい(1つの固定された構成要素がDNA合成を遮断し、従って細胞に対して毒性作用を与える)。このアレイを使用して、第一の化合物のこの毒性作用を抑制する第二の試薬をスクリーニングすることができると考えられる。種々の免疫不全疾患において、免疫細胞は、同種抗原または自己抗原に反応して増殖しない。培養免疫細胞および前述の方法を使用して、免疫細胞の増殖を促進する試薬の組み合わせをスクリーニングすることができる。または、自己免疫抑制剤をスクリーニングすることができる。この例において、免疫細胞の1つの種の集団(末梢血細胞から単離されたB細胞またはT細胞)を同種



抗原または自己抗原によって刺激する。自己抗原に反応して増殖を特異的に阻害するが、同種抗原に反応して特異的に増殖を阻害しない化合物の組み合わせは、有用な自己免疫治療候補薬である。

#### 【0109】活性を検出する他の方法

前述のサイトプロット方法は、BrdU以外の抗原の検出に容易に適合させられる。さらに、細胞内の種々の翻訳後修飾を検出することができる。例えば、ヌクレオリンまたはヒストンH3のリン酸化型に対する抗体は、細胞周期のM（有糸分裂）期にある細胞を検出するのに有用である。従って、サイトプロットアッセイ法においてリン酸化ヌクレオリンまたはヒストンH3の増加を生じる化合物の組み合わせは、M期に細胞を停止させ、抗癌剤であると思われる組み合わせとなると考えられる。例えば、アセチル化ヒストンH4を特異的に認識する抗体を使用して、ヒストンH4のアセチル化の増加を検出するためにサイトプロットアッセイ法を使用してもよい。ヒストンH4の過剰アセチル化（hyperacetylation）の増加を生じる化合物または化合物の組み合わせも抗癌剤である可能性がある。

【0110】前述の例において、培地を除去し、固定液（70%エタノールまたは4%ホルムアルデヒド（PBSまたはTris緩衝食塩水を溶媒とする））を添加するという点において手法を変更することができる。次いで、固定液を除去し、透過処理剤（例えば、Tween 20、TritonX-100またはメタノール）を添加することによって、細胞の膜を透過処理にする。膜透過処理剤を除去し、次いで細胞をPBSまたはTris緩衝食塩水にて洗浄し、次いで、一次抗体を添加する。通常、これらの他のサイトプロット態様を使用したとき、酸変性段階はない。

#### 【0111】レポーター遺伝子アッセイ法

試験要素の特性の測定は、レポーター遺伝子を使用して実施することができる。この方法は、試薬（例えば、安定に形質転換した細胞系統）を調製したら、アッセイ法は例えばサイトプロットアッセイ法より実施が容易で、時間がかからない。レポーター遺伝子は、発色、蛍光、発光、または酵素特性により容易に検出されるポリペプチドをコードするレポーター要素、およびレポーター遺伝子の発現に特異性を与えるエンハンサー/プロモーター要素を含む。レポーター要素には、ルシフェラーゼ、 $\beta$ ラクタマーゼ、緑色蛍光炭水化物、青色蛍光タンパク質、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、 $\beta$ ガラクトシダーゼ、およびアルカリホスファターゼが挙げられるが、それらに限定されることはない。エンハンサー/プロモーター要素には、例えば、NFAT、p53、TGF- $\beta$ 、または応答するプロモーター/エンハンサーが既知である任意の他のシグナル伝達経路もしくは刺激に反応するものが含まれる。

#### 【0112】NFkB

1つの市販のレポーター遺伝子は、NFkBが活性化された

場合に光線を生ずるルシフェラーゼレポーター遺伝子、pNFkBである（Stratagene, La Jolla, CA）。このレポーター遺伝子は、関心対象の細胞系統（すなわち、A549ヒト肺癌細胞）を安定的または一過的にトランスフェクションすることができる。安定的にトランスフェクションした細胞系統を作製するために、pNFkBプラスミドDNAをG418抵抗性プラスミドおよびトランスフェクション試薬（例えば、リポフェクタミン、Life Technologies, Inc., Rockville, MD）と混合し、A549または他の細胞をペトリ皿に約40%の集密度で接着させた10 cmのペトリ皿に添加する。DNA/リポフェクタミンを含有するプレートを37°Cにおいて4~16時間5% CO<sub>2</sub>雰囲気下でインキュベーションする。培地を除去し、細胞を無血清培地で2回洗浄し、次いで10%ウシ胎児血清アルブミン（FBS）を含有する培地を添加する。G418を、偽トランスフェクションにおいて全ての細胞を死滅させるのに十分である用量（約700  $\mu$ g/mL）を添加する（すなわち、G418-抵抗性プラスミドを用いないトランスフェクション）。細胞を37°Cにおいて5% CO<sub>2</sub>雰囲気下で2週間インキュベーションし、3日ごとに培地を交換する。安定にトランスフェクションしたクローンは、2週間の終了時までには小型のクローンとして増殖し、これらのクローンはリングクローニングによって分離し、別個に増殖させる。G418-抵抗性クローンは、一過的にトランスフェクションしたNFkBが存在する場合に、または存在しない場合に細胞溶解物からの光線の出力を測定することによって、関心対象のレポーター遺伝子についてスクリーニングされる。クローンを安定的にトランスフェクトしたpNFkBで同定したら、アッセイプレートに細胞を播種することによってスクリーニングに使用する。

【0113】一過的なトランスフェクションアッセイ法では、pNFkBプラスミドDNAをトランスフェクション試薬と混合し、例えばA549細胞を約70%集密度まで接着した10cmペトリ皿に添加する。DNA/リポフェクタミンを含有するプレートを37°Cにおいて5% CO<sub>2</sub>雰囲気下で4~16時間インキュベーションする。培地を除去し、細胞を無血清培地で2回洗浄し、次いで、10%FBSを含有する培地を添加する。細胞を37°Cにおいて5% CO<sub>2</sub>雰囲気下で24時間インキュベーションし、次いでスクリーニングするためにアッセイプレートに播種する。

【0114】レポーター遺伝子は、ウィルスまたはレトロウィルス感染、バイオリスティックインジェクションおよび裸のDNAの細胞内取り込みを含むが、それらに限定されることはない他の技術を使用して細胞内に導入することができる。当業者は、アッセイされる細胞内へのレポーター遺伝子の任意の導入方法が本明細書に記載されるスクリーニング方法に適合可能であることを認識すると思われる。

【0115】レポーター遺伝子を含有する細胞が入手されたら、それらをピペット、マルチチャンネルピペッ



ト、384ウェルマルチドロップ(Multidrop)プレートフィルター(Labsystems, Franklin, MA)、または他の液体取り扱い装置によりアッセイプレート(96ウェル、384ウェル等)に播種する。いくつかの方法の1つによる組み合わせを形成するために化合物を添加する。4~72時間後、培地を除去し、細胞をHBSSで2回洗浄し、溶解緩衝液を添加し(Stockwellら、J. Amer. Chem. Soc. 1999, 121: 10662~106631を参照のこと)、ATP/ルシフェリンを添加し、プレートリーダーまたはルミノメーター(例えば、LJL BioSystems Inc., Analyst AD, Sunnyvale, CA)で発光を測定する。

【0116】蛍光共鳴エネルギー移動アッセイ法別の例において、蛍光共鳴エネルギー移動アッセイ法(FRET)を、関心対象の2つのタンパク質の相互作用を検出し、測定するために使用する。この例では、第一のタンパク質および第二のタンパク質に緑色蛍光タンパク質(GFP)および青色蛍光タンパク質(BFP)をそれぞれ、標準的な分子生物学的方法を使用して融合させる。2つの融合タンパク質をコードするDNA構築物を、上記のトランスフェクション技法または他の匹敵する方法を使用して、哺乳類細胞、酵母、蠕虫、または他の細胞もしくは生物において同時発現する。化合物の組み合わせを添加する。プレートをプレートリーダー上に配置し、以下のように蛍光を測定する。ドナー蛍光団(すなわち、BFP)は励起し、アクセプター蛍光団(すなわち、GFP)の発光を測定する。2つのタンパク質がより接近すると、アクセプター蛍光団の発光が増加する。従って、関心対象の2つのタンパク質を互いに接近させる化合物の組み合わせは、アクセプター蛍光団の蛍光の増加によって同定される。

【0117】例えば、Smad2およびSmad4を含有する発現ベクターを入手する。GFPのcDNAをSmad2の5'側末端に融合させ、BFPのcDNAをSmad4の5'側末端に融合させる。これらの発現ベクターを哺乳類細胞に安定的にまたは一過的にトランスフェクションし、細胞を化合物の組み合わせで処理し、BFPを励起するがGFPを励起しない光線をプレートに照射する。GFPの蛍光(例えば、512 nmの光線)を測定し、この波長の光線発光の増加を生ずる化合物の組み合わせを同定する。このような組み合わせは、Smad2およびSmad4の距離を互いに接近させ、TGF- $\beta$ シグナル伝達を活性化させ、従って癌化学療法の粘膜炎および自己免疫疾患を治療するのに有用となりうる。

【0118】蛍光カルシウム指示薬色素試験要素の特性の変化の別の読み取りは、fluo-3(Molecular Probes, EugeneWA; <http://www.molecularprobes.com>)、fura-2、およびindo-1などの蛍光カルシウム指示薬色素を利用する。Fluo-3は、 $\text{Ca}^{2+}$ に結合しない場合には本質的に非蛍光であり、~0.14の飽和 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度において量子収率を示す。従って、fluo-3AM(fluo-3AM)の無傷のアセトキシメチルエステル誘導体も非蛍光である。

$\text{Ca}^{2+}$ 結合したfluo-3の緑色-蛍光発光(~525 nm)は、フルオレセイン(FITC)について設計された光学的フィルターセットを使用して簡便に検出される。製造業者の指示によると、fluo-3は少なくとも100倍の $\text{Ca}^{2+}$ 依存的蛍光増強を示す。

【0119】細胞をウェルに播種し、製造業者の指示により、fluo-3を細胞に添加し、プレートリーダーを使用して蛍光を測定する。従って、蛍光を増加させる(しかし自身は蛍光性ではない)化合物の組み合わせは、細胞内カルシウム濃度の増加を生じる。

#### 【0120】蛍光顕微鏡

別のアッセイ法は、化合物の組み合わせに接触させた細胞における蛍光のレベルまたは位置の変化を検出するための従来の蛍光顕微鏡を使用する。一例において、GFP標識したSmad2を発現する安定的にトランスフェクションした細胞系統を使用する。細胞を播種し、化合物を添加し、1時間インキュベーションし、自動ステージ付蛍光顕微鏡を使用して各ウェル内の細胞を画像化する。標識タンパク質の位置の変化を生ずる化合物の組み合わせを同定する。例えば、GFP-Smad2を核の外側から核の内側に移動させる組み合わせをこの方法で同定することができる。これらの組み合わせは、TGF- $\beta$ シグナル伝達を活性化し、従って、癌、自己免疫疾患、および粘膜炎を治療するのに有用となりうる。

【0121】cDNAアレイによる発現プロファイリング試験要素の変化を生じる化合物を検出する別のアッセイ法は、発現プロファイリングである。この例では、細胞を播種し、化合物の組み合わせを添加し、細胞を2~24時間インキュベーションする。ポリA RNAを、標準的な方法を使用して各ウェルから回収する。蛍光色素(例えば、Cy3-dUTP)を逆転写の間に導入することを除いて、標準的な方法を使用してRNAをcDNAに逆転写する。Cy3標識cDNAを未処理の細胞のCy5-標識cDNAと混合し、DNAマイクロアレイ(例えば、Nature Genet. Suppl. 21, Jan 1999(参照として本明細書に組み入れられている)に参照されている、Affymetrix, Santa Clara, CAまたはIncyte, Palo Alto, CAから購入可能なDNAマイクロアレイ)にハイブリダイゼーションする。マイクロアレイの各スポットにおけるCy3およびCy5の相対的なレベルは、各遺伝子の発現の変化であることを示す。この方法は、疾患遺伝子発現プロファイルから健康なプロファイルへの回復などの遺伝子発現の望ましい変化を生じる組み合わせを同定するために使用される。または、インスリンなどの、所与のシグナリング分子によって生じる発現プロファイルを測定し、インスリンプロファイルを生じる化合物の組み合わせを見出す。これは、これらの組み合わせがインスリンの作用を模倣することを示している。

#### 【0122】生物全体

本明細書に記載するスクリーニングアッセイ法に適合可能な別のバイオアッセイ法は、動物全体を使用する。一

例において、線虫 *C. elegans* (*C. elegans*) を個々のウェルに配置し (好ましくは、ウェルあたり1匹より多い線虫)、生物の特性の変化を検出することによって化合物の活性を検出する。例えば、ライフサイクルの特定の段階において、または耐久型期 (dauer state) にのみ緑色蛍光タンパク質を発現するように線虫を操作することができる。自動式顕微鏡システムを使用して、各ウェルの線虫を画像化し、緑色蛍光タンパク質を測定するか、または化合物の特定の組み合わせによって生じる蠕虫の形態変化を検出する。

【0123】別の動物全体アッセイ法は、皮膚表面上または皮膚表面付近に腫瘍を有するヌードマウスなどの大型動物を使用する。化合物の組み合わせは、皮膚にすりこみ、皮膚に浸透し、腫瘍に到達するDMSO中の混合物であってもよい。または、化合物は静脈内、筋肉内、または経口投与することができる。活性を検出するための他の生物全体方法は、規定の培地中で発生する受精したアフリカツメガエル卵母細胞から誘導される小型オタマジャクシ、規定の培地中で一定の期間にわたって器官を培養することができる器官型培養物 (マウスまたは他の動物の外植片) および種々の動物の卵 (受精または未受精) を使用することを含んでもよい。別のアッセイ法は、2つのバネの間で伸縮する心筋組織または筋組織の緊張を測定し、収縮を調節する化合物の組み合わせは、それらのバネの緊張を増加または低下させると思われる。

【0124】化合物の標識化  
組み合わせた実体のいずれをも標識しない場合にも一部のアッセイを実施することができるが、いくつかの態様において、試験要素に対する組み合わせの作用を検出または測定することができるように、組み合わせた実体の1つまたはそれ以上を標識する。例えば、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用またはヘキサヒスチジン標識タンパク質を使用したタンパク質のアフィニティークロマトグラフィーのために生化学において広範に使用されているような技法のような多種多様の既知の任意の標識を使用することができる (Janknechtら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88:8972; Wilcheckら、Methods in Enzymology, Wilcheck, M; Bayer, E. A. Eds. Academic Press Inc. San Diego, 1990; pp123~129)。

【0125】分子の組み合わせ  
本発明の方法は、1週間あたり150,000までの化合物をスクリーニングすることができる、既存のロボット工学システム、96-ウェル、384-ウェル、1536-ウェル、または他の高密度ストックプレート、および96-、384-または1536-ウェル、または他の高密度アッセイプレートを使用することができる。この技術の自動化は、分子の組み合わせをスクリーニングするために本発明により改良することができる。本発明の方法はまた、従来のフォトリソグラフィーまたは工程を小型化する従来ではない方法

(ソフトリソグラフィーまたはニアフィールド光学的リソグラフィーなど) を使用してもよい。本発明の方法はまた、インクジェットプリンティングまたは化合物プリンティング技術を使用してもよい。また、本発明の方法は、ロボット工学システムと同一の結果およびスループットを達成するために、熟練した技術者を使用してもよい。化合物の組み合わせを実施してから、試験要素と接触させても、または試験要素の存在下においてインサイチューで化合物を組み合わせてもよい。これらのプレーティングは以下にさらに詳細に記載されている。

#### 【0126】手動式プレーティング

化合物は手動により、プレーティングしてもよい (すなわち、試験する細胞に添加してもよい)。一例において、精製した化合物を手動で組み合わせ、7×7コンビナトリアルアレイにおいて試験する。この場合に7つの化合物を含む化合物はストックプレート内に存在する。化合物をアッセイプレート内で組み合わせる。オペレーターはストックプレートのウェルから第一の化合物 (または、複数の化合物) をアッセイプレートの1列に配置し、次いでアッセイプレートの1カラムに配置する。これをストックプレートの第二のウェルを用いて反復し、アッセイプレートへのプレーティングのみが、第一の化合物をプレーティングしたものから列およびカラムを形成する。この過程を、組み合わせの完全なセットがプレーティングされるまで反復する。

#### 【0127】ロボットプレーティング

コンビナトリアルアレイを形成するためにウェルに化合物を添加するための数多くの方法があり、当業者は、以下の例は例示的な目的のためで、どのようにも限定的でないことを認識すると考えられる。

【0128】ロボットプレーティングの一例では、ロボット液体移動システムを使用する。移動システムは、例えばBeckman Coulter (Fullerton, CA)、Tecan (Research Triangle Park, NC) またはZymark (Hopkinton, MA) から購入可能である。ロボットシステムは、列1が同一の化合物を有し、列2が同一の化合物を有するように所定の列の各ウェル内に規定の容量の第一のセットの化合物をプレーティングする。次いで、液体移動装置は、各カラムが同一の化合物を収容するように (しかし、異なるカラムは異なる化合物を収容する)、カラムに沿って同じセットの化合物をプレーティングする。移動システムは、小容量 (例えば、1nL) を移動するように改良することができる。

【0129】効果的な移動のための別の方法はインクジェット技術を使用する (Gordonら、J. Med. Chem. 1994, 13: 1385~1401; Lemmoら、Curr. Opin. Biotechnol. 1998, 9: 615~617)。インクジェットプリンターは試験化合物を含有する複数の容器から液を出す; ソースウェルの各化合物を、各化合物のおおの個々の列およびカラムの表面にプリントアウトまたは注入する。上

記のように、次の化合物は次の列および次のカラムにプリントアウトされ、グリッド全体に化合物の組み合わせがプレーティングされるまでこれを反復する。

【0130】アッセイプレートに化合物を添加するためのさらに別の方法は、DNAをスポットするためにスタンフォード大学のPatrick Brownによって開発されたマイクロアレイスポッターを使用する。この装置は、ストックプレートに浸漬し、全ての列にプリントする8-キルペンプリンティングヘッドおよび8リニアキルヘッドを使用する。その後、プレートが90度回転するか、またはプリンティングヘッドが90度回転する；次いで、プリントヘッドはカラムにプリントする。例えば、標準的な384ウェルプレートの2、4または16のプリントヘッドおよびより高密度プレートのより多い数を使用してプリントヘッドのサイズを変更してもよい。

【0131】アッセイプレートに化合物を添加するさらに別の方法は、化合物の標準的なストックプレートから既知の用量を滴下することができる384の別個のシリンジを備えることができる、Hydra (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA) と呼ばれる市販の機器を使用する。

【0132】試験化合物をプレーティングするための別の方法は、Caliper Technologies (Mountain View, CA) から購入可能であって、この組み合わせを作製すると思われるアレイを作製することにそのシステムを直接適用するものなどのマイクロ流体工学システムを使用する。この場合には、マイクロスケールの組み合わせのアレイは、マトリックスの交点に化合物溶液を分配する毛細管流動を使用して作製される。

【0133】別のプレーティング方法  
当業者は、任意のプレート構造を本発明のスクリーニング方法に適合することができることを認識すると思われる。例えば、16×16スクエアプレートは、16×24プレートの384ウェルの代わりに256ウェルを有すると思われる。これにより、単純に四角プレートを90度回転して、他の方向に添加することができるので、列にだけまたはカラムにだけ液体を添加する任意の液体添加システムを適合することができる。また、適合したマイクロスクエアプレートを任意の既存のプレート液体取り扱いシステム内にフィットするように、標準的な96ウェルまたは386ウェルのマイクロタイタープレートの寸法またはフットプリントを有するスクエアプレートホルダーをこの設計に導入してもよい。

【0134】組み合わせにおいて試験される化合物または要素を提供する別の方法は、液体ではなく、例えば少量の乾燥粉末のような固形の形態でそれらを提供することである。従って、2つの乾燥成分（または一方は濡れた成分で、一方は乾燥した成分）を混合して、次いで組み合わせを（組み合わせた実体が可溶性である）培地中の細胞に添加する。固形化合物は、異なる化合物を添加する組み合わせ合成 (combinatorial synthesis) から

のビーズを含む。例えば、ビーズはビーズピッカーで添加してもよい。一例において、ビーズは磁気で、磁石を使用して添加される。

【0135】本発明のロボット工学適用の高スループットアッセイ法では、各ウェルは独立に間隔をおいて処理されなければならない、好ましくは、ストックプレートから大容量（100μLまで）および小容量（1nLまで）の各化合物を引き出すことができる。本発明のコンビナトリアルスクリーニングアッセイ法を実施するための例示的なロボットプラットフォームを以下に記載する。

【0136】2ステーション式ロボットプラットフォームを作製する。第一のステーションはVWR (cat#62409-608) により入手可能なものなどのピントランスファー装置が取り付けられた単純なXYZロボットアームを有する。ストックプレートおよびアッセイプレートはステーション内に入り、ロボットアームがストックプレートにピンを投入し、これらのピンをアッセイプレートに移動することによってピンのサイズに応じて1~1000nLを送達する（最も典型的には、50nLが送達される）。異なるピン装置により、上記した例のように、化合物の異なる組み合わせを移動することができる。ロボットの第二のステーションは、1つの化合物のストックウェルから大容量（10マイクロリッターまで）を引き出して、次いでアッセイプレートの各ウェルに小容量を分注することができるピエゾ電気式分注器である。例えば、Ivek Digispense 2000システム (<http://www.ivek.com/digi2000.htm> 1) は10nLの分解能を有し、この目的に十分であるはずである。

【0137】非化合物組み合わせ試薬  
実体プレートに存在する組み合わせ試薬が化合物でない場合には（すなわち、なんらかの形態の放射線である場合）、細胞および添加された化合物を含有するプレートは放射線源を通過させることによって、組み合わせの形成を完了することができる。他の形態の非化合物組み合わせ試薬には、例えば高圧および熱が含まれる。

【0138】非化合物試薬は、化合物の添加と同様の方法で変更することができる。例えば、pHを変更するためには、異なる量の塩基または酸をウェルに添加する。同様に、化合物の添加に適用可能な任意の方法を使用してイオンを添加することができる。

【0139】ライブラリーサイズ  
小型化学物質ライブラリー（<1000化合物）では、全てのライブラリー（50万までの組み合わせ）および第三の組み合わせ（数百万までの組み合わせ）を本明細書に記載されるシステムを使用して試験することができる。

【0140】組み合わせの力は、多変量治療を同定するのに効果的なライブラリーを速やかに形成する。多変量治療ライブラリーのサイズは速やかに競争し、任意の従来の入手可能な多様性ライブラリーまたは非多様性ライブラリーにわたり拡大する。対応のある組み合わせの20

0の化合物のライブラリーは、細胞分裂に影響を与える新規化合物を同定するために最近使用されている天然産物ライブラリーよりサイズが大きい、19,900の組み合わせの多変量治療ライブラリーを作製する(Mayerら、Science, 1999, 286, 971~974)。3ウェイ組み合わせにおける300化合物のライブラリーは、現在形成されている最も大きいコンビナトリアル・ケミストリーライブラリーより大きく、おそらくより大きい多様性を有する、多変量治療ライブラリーの約450万の別個の組み合わせを作製する。

#### 【0141】活性順位付けスクリーニング

標準的な方法を使用して、多様性ライブラリーを最初に個別に試験することができる。化合物は生物学的アッセイ法においてスクリーニングされ、活性によって格付けされる。次いで、ライブラリーの最も活性化化合物(例えば、アッセイされる組み合わせ空間(combinatorial space)の量に応じて、20の最も活性化化合物、または1000の最も活性化化合物)を対応のある組み合わせおよび3-ウェイ組み合わせで試験する。望ましい場合には、これらの組み合わせは活性によって格付けすることができ、望ましい数の効果的な組み合わせが同定されるまで、この過程を4-ウェイ組み合わせ、5-ウェイ組み合わせ等について反復することができる。

#### 【0142】遺伝的アルゴリズム

遺伝的アルゴリズムの使用により、1つの薬剤自体とは別個の望ましい生物学的活性を有する薬剤の組み合わせを同定する別の方法が提供される。この方法では、各1薬剤に、任意のシリーズの数、文字、または他の記号であってもよい独自のバーコードを割り付ける。好ましい様式の態様において、バーコードはバイナリーコード(ゼロおよび1)である。可能な対応のある組み合わせの総合プールから、対応のある組み合わせの特定の数(N、「母集団サイズ」)を選択し(無作為またはいくつかの他の特徴に基づいて)、これらの組み合わせの各々の活性を測定する。母集団の最も活性化メンバーXを選択する(XがNより小さい場合)。(i)複製(元の組み合わせが再び単純に選択される)、(ii)変異(バーコードの1ビットが異なる値に変異する)、および(iii)組換え(2つのバーコードが各々中点で分割し、対向末端が結合して2つの新規ハイブリッドバーコードを作製する)を含む一連のオペレーターを使用して、Xの活性化組み合わせからNの新規組み合わせを形成する。この選択、増幅、変異、および組換え過程を数多くのサイクルにわたって反復し、薬剤の各組み合わせの活性を各サイクルの終了時に測定する。これは、限られた数の組み合わせを試験する方法を提供すると同時に、薬剤の有効性の高い組み合わせを発見することを可能にする。

【0143】遺伝的アルゴリズム(または他のアルゴリズム)のパラメーターを最適にする方法は以下のものである:N薬剤のC組み合わせを検討に選択する。(N!)の全

セットの各メンバーの活性/(N-C)!(C!)組み合わせ、を測定する。さらに、全てのより低い次数の組み合わせを同様に測定することができる。この活性の十分なデータセットを用いて、種々のアルゴリズムの成功および有効性、またはさらに「湿式」ベンチ作業を実施することなく1つのアルゴリズムの種々の順位を評価することが可能である。すなわち、活性のある組み合わせを発見するための全ての方法を「コンピューター内(in silico)」で比較することができ、それらの相対的な性能を比較することができる。

#### 【0144】ストック溶液

2種類のストック溶液を維持する。各化合物は両方のストック様式で寄託される。第一のストック溶液様式は、最終濃度4 mMで100マイクロリッターのジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、384ウェルポリプロピレンプレート(Matrix Technologies)に保存した化合物を含む。第二の種類のストック溶液は、最終濃度4 mMで1500マイクロリッターのDMSOに溶解し、深型ウェル96ウェルポリプロピレンプレートに保存した化合物からなる。各種のプレートの多数のコピーを作製する。ストックプレートの1コピーを、通常の用途のために-20℃において保存し、バックアップコピーを長期保存のために-80℃において保存する。

#### 【0145】アッセイプレート

3種のアッセイプレートを使用する。上記のピン移動装置のピンのサイズは、各サイズのアッセイプレートを収容するように適合される。

- 1)市販の384ウェルプレート(例えば、NalgeNunc白色不透明なポリスチレン細胞培養処理済み滅菌プレート、catalog#164610)
- 2)市販の1536ウェルプレート(例えば、GreinerまたはCorning)
- 3)特注製造した1536または6144ウェルプレート(ポリジメチルシロキサン製、Dow Corning)およびdelranモデルおよびOmniトレイ。

#### 【0146】化合物の添加を管理するためのソフトウェア

上記の機器を操作するためにソフトウェアを書き込むために、従来のプログラム技法を使用して、マイクロソフトビジュアルベーシック(Microsoft Visual Basic)またはプログラム言語を使用する。プログラムにより、機器はストックプレートまたはアッセイプレートのバーコードを読むことができ、アッセイデッキ上のプレートの位置を追跡することができ、適当な用量の適切な化合物を適切なアッセイウェルに移動することができる。従って、スクリーニングされる全ての組み合わせをあらかじめ測定または選択し、機器は、アッセイデッキに規定されたプレートを配置する段階およびアッセイデッキから規定されたプレートをインキュベーターから取り出す段階などの、単純なオペレーター段階だけを必要とする自

動式様式でコンビナトリアルスクリーニングを実施する。

【0147】バーコードリーダーおよびプリンター。各プレートの独自の識別番号を作製し、ラベルにバーコードをプリントし、アッセイプレートまたはストックプレートにラベルをスタンプするために、標準的な技法を使用してバーコードプリンターを使用する。ソフトウェアは、各アッセイプレートおよびストックプレートの各ウェル中の各化合物の性質を記録する。アッセイデッキに結合したバーコードリーダーは、それが流入し、アッセイデッキを出るとき各プレートをスキャンする。

【0148】以下の実施例は例示的な目的のために提供されており、いかなる限定も意図していない。

【0149】

【実施例】実施例1

図1は、試薬が同じ細胞の異なる標的に結合する場合に、2つの異なる試薬が細胞の内部でどのように相乗的に作用するかを示す概念図である。この図において、化合物A(10)および化合物B(12)は原形質膜(14)を通過し、哺乳類細胞の細胞質ゾル領域に自由に拡散する。化合物Aは、キナーゼであるタンパク質X(16)に結合し、このキナーゼの活性を阻害する。キナーゼXは、通常、Yにリン酸基を付加することによって、転写因子Y(18)を不活性化化する。化合物AがキナーゼXを阻害すると、転写因子Yが活性化され、Yは核内に移動し、インスリンなどの治療遺伝子のエンハンサー領域のDNAに強く結合する。しかし、転写因子Yは、第二の転写因子Z(20)が存在しない場合にはインスリンの発現を活性化できない。しかし、図では、化合物Bが、転写因子Zに結合して、この転写因子の自己抑制性ループを除去することによって、この転写因子Zを核内に移動させ、転写因子Yと結合する。YおよびZは一体として治療遺伝子、インスリンの発現の活性化を可能にするが、単独では可能にしない。

【0150】図2は、試薬が異なる細胞または組織の標的に結合する場合に、2つの異なる試薬が生物の内部でどのように相乗的に作用するかを示す概念図である。この図では、化合物A(50)は膵臓(54)のβ島細胞(52)に拡散する。化合物Aは、インスリン(56)をコードする治療遺伝子をこれらの細胞中で発現させる。しかし、インスリンは、脂肪組織における標的脂肪細胞上にインスリン受容体が存在しない場合には無効である。一方、化合物Bは脂肪組織(60)における脂肪細胞(58)に拡散し、これらの細胞中でインスリン受容体(62)の発現を刺激する。AおよびBは一体としてこの個体においてインスリンの活性を回復させるが、一方の単独では回復させない。

【0151】図3から図7は、本特許明細書において本発明者らが記載する種類のコンビナトリアルスクリーニングにおいて得られる実験データの例である。5つの異なる384ウェルプレートの結果を示す。結果は、A~Pまでラベルした16列および1~24までラベルした24カラムか

らなるプレート様式で示す。活性レベルは各ウェルにおいて数で示し、1は基底状態の活性(影響なし)を意味し、5は活性の組み合わせが見られることを意味する。プレート1は、A549ヒト癌細胞(以下に記載する)において細胞周期停止活性についてプロモデオキシウリジンサイトプロットアッセイ法において4μg/mLで試験したときの、化合物1~384の活性を示す。プレート2は、同アッセイ法において2μg/mLで試験したときの、化合物1~384の活性を示す。プレート3は、同アッセイ法において4μg/mLで試験したときの、化合物385~768の活性を示す。プレート4は、同アッセイ法において2μg/mLで試験したときの、化合物385~768の活性を示す。プレート1~4では、化合物のどれもいかなる活性も示さないことに注目されたい。プレート5は、2μg/mLで試験したときの(すなわち、化合物1~384および385~768を共に各化合物2μg/mLの濃度でアッセイプレートに同時に添加し、384の異なる無作為な対応のある組み合わせを作製する)、384の対応のある化合物の組み合わせの活性を示す。ウェルA1は活性を示すことに注目されたい。これは、化合物1(化合物1~384のプレートのウェルA1)自体は活性を持たず、化合物385(化合物385~768のプレートのウェルA1)自体は活性を持たないが、化合物1および385は一体として相乗的に作用して活性な組み合わせを作製することを意味する。

【0152】実施例2

一般的方法

図8は、現在市販により入手可能な技術を使用してコンビナトリアルスクリーニングを実施する方法の模式図である。ヒトA549肺癌細胞をアメリカンタイプカルチャーコレクション(American Type Culture Collection)(ATCC、カタログ番号CCL185)から入手し、10% FBS、100単位/mLペニシリンGナトリウム、100μg/mL硫酸ストレプトマイシン、および2 mMグルタメート(GibcoBRL, Rockville, MD)を含有するダルベッコの改変イーグル培地(DMEM)(10%培地と呼ぶ)中で37°Cにおいて5%CO<sub>2</sub>雰囲気下で培養する。白色不透明な384-ウェルプレート(100)(NalgeNunc International, Rochester, NY)の各ウェルに、マルチドロップ384液体ディスペンサー(110)(Lab Systems Microplate Instrumentation Division, Franklin, MA)を使用して4000細胞を播種する。細胞は40μLの10%FBS含有培地に播種する。

【0153】37°Cにおいて5%CO<sub>2</sub>雰囲気下で16時間後、関心対象の化合物の10%培地における50μMストックの10μLを各ウェルに添加し、総ウェル容量を40μLにし、この化合物の最終濃度を10μMとする。その前、直後、または数時間後もしくは数日後に、ピンアレイ130の小さいピンをストックプレート(140)または(150)の各ウェルに浸漬し、次いでアッセイプレート(100)の各ウェルに浸漬することによって第二のセットの化合物を添加する。マトリックステクノロジーピントランスファー(Ma



trix Technologies Pin Transfer) 装置(130)(384または96ピン)が十分であると考えられる(カタログ番号350500130および350510203)。この二段階方法により、多数の対応のある組み合わせにおいて、1つの特定の化合物を大多数の他の化合物に対して試験することが可能になる。新規特性が組み合わせで達成されるかどうかを判定するために、元の化合物(全てのウェルに存在する化合物)が存在しない場合に、ピン移動化合物のセットを試験するプレートを用意することも必要である。

【0154】試験要素と接触させる化合物の組み合わせを提供するために、異なる方法を使用することもできる。例えば、上記のように、対応のある組み合わせ全体に1つの化合物を固定させないで、そのセットの全ての対応のある組み合わせが達成される方法で化合物のセットをピン移動することができる。16化合物のセットをストックプレート(140)から384ウェルアッセイプレート(100)の16列にピン移動する。次いで、同じ16化合物のセットを同アッセイプレートの16カラムに移動して、異なる対応のある組み合わせを有する256ウェルマトリックスを提供する。

【0155】前述の実施例の各々(または類似の形態)において、望ましい化合物を全て添加した場合に、A549および化合物を含有するアッセイプレートをインキュベーター(120)で37℃において5%二酸化炭素雰囲気下において48時間インキュベーションする。この時間の終了時に、マルチドロップ384(110)を使用して、培地の50  $\mu$ Mストック(PBS、pH 7.4の10 mMストックから調製)から10  $\mu$ LのBrdUを添加し、最終濃度10  $\mu$ M BrdUとする。細胞を37℃において5%CO<sub>2</sub>雰囲気下においてインキュベーター(120)でさらに12~16時間インキュベーションする。吸引のためにプロトコール全体で使いし、ハウス真空源に取り付けた24-チャンネルワンド(V&P Scientific)を用いて各ウェルから上清を除去した。細胞は冷却した50  $\mu$ Lの(4℃)70%エタノール/30%PBSで固定し、氷上で1時間インキュベーションし、90  $\mu$ Lの冷却した(4℃)PBSで洗浄し、次いで25  $\mu$ Lの2M HCl/0.5%Tween 20/ddH<sub>2</sub>Oを添加する。細胞を室温において20分間インキュベーションし、90  $\mu$ Lの10% 2M NaOH/90%ハンクスの平衡塩類溶液(HBSS, GibcoBRL)で洗浄し、90  $\mu$ LのHBSSで2回、75  $\mu$ LのPBSTB(PBS, 0.1% Tween 20(Sigma), 0.5%ウシ血清アルブミン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))で1回洗浄する。次いで、0.5  $\mu$ g/mLのマウス抗BrdU抗体(ストックの1000倍希釈、(BD Biosciences-PharMingen San Diego, CA))およびHRPに結合した2000倍希釈の抗マウスIg抗体(Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ)をPBSTB中に含有する20  $\mu$ Lの抗体溶液を添加する。細胞を室温において1時間インキュベーションし、90  $\mu$ LのPBSで2回洗浄し、次いで20  $\mu$ LのHRP基質溶液を各ウェルに添加する。Amersham ECL検出キットの等容量の溶液1および溶液2を混合することによってHRP基質溶液を得

る。プレートをLJL Biosystems Inc.(Sunnyvale, CA)アナリストAD プレートリーダー(160)に配置し、各ウェルの発光を0.3秒検出する。次いで、組み合わせの活性を、元の濃度および元の濃度のN倍の両方において1つの薬剤単独の活性と比較する。ただし、Nはスクリーニングに見出される活性ナトリウム化合物の数に等しい。組み合わせが元の濃度および元の濃度のN倍の両方において1つの薬剤単独の各々の活性より大きい場合には、相乗作用が観察された。相乗作用が観察されない場合でも、組み合わせは、組み合わせを形成する個々の構成要素と比較したとき、有利な特性(例えば、低い副作用)を有する場合がある。

【0156】前述の方法は、2つの異なる化合物を第一の段階において添加し、3-ウェイ組み合わせの試験を可能にするように容易に改良される。同様に、3つの化合物を添加して、4-ウェイ組み合わせ等の試験を可能にすることができる。このような方法を使用すると、より高次数の化合物の組み合わせが試験される。

【0157】増殖を阻止する化合物の組み合わせの同定を以下に記載する。この記載は例示的な目的のものであり、いかなる場合においても限定的であるべきではない。

【0158】7つの化合物を単独および21の全ての可能な対応のある組み合わせで、BrdUサイトプロットアッセイ法(以下を参照)において細胞周期進行に対する作用を試験した。7つの化合物(ポドフィロトキシン(podophyllotoxin)、パクリタキセル(paclitaxel)、キナクリン(quinacrine)、ベプリジル(bepiridil)、ジピリダモール、プロメタジン、およびアグロクラビン(agroclavine); 各々Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MOより購入した)をガラスバイアルに1グラムを秤量し、ジメチルスルホキシドに溶解して4 mg/mLストック溶液を作製した。6000のA549肺癌細胞を、384の白色不透明NalgeNunc細胞培養処理済みプレート(cat#164610)の各ウェルに10%培地(全てLife Technologiesから入手した; 10% ウシ胎児血清アルブミン、100単位/mLペニシリンGナトリウム、100  $\mu$ g/mL硫酸ストレプトマイシン、および2 mM グルタメート(GibcoBRL, Rockville, MD)を含有するダルベッコの改変イーグル培地)30  $\mu$ Lに播種した。各化合物を最終アッセイ濃度まで10%培地で4倍希釈した(最終アッセイ濃度は0.25%DMSO、240nMポドフィロトキシン、60 nMパクリタキセル、420 nMキナクリン、25  $\mu$ Mベプリジル、400 nMジピリダモール、25  $\mu$ Mプロメタジンおよび840nMアグロクラビン)。培地中の化合物の各4×ストックの15マイクロリッターを、7つの化合物の全ての可能なバイナリー組み合わせおよび1つの薬剤自体が試験されるように、8カラムおよび8列の四角(第8列は基剤DMSOだけを含有する)の1つの列および1つのカラムに添加した。細胞を37℃において5%二酸化炭素雰囲気下で46時間インキュベーションした。10%培地中のB



rdU 50  $\mu$ M溶液の15  $\mu$ Lを添加することによって、BrdUを10  $\mu$ Mの最終濃度まで添加した。細胞を37°Cにおいて5%二酸化炭素雰囲気下で一晩インキュベーションした。

【0159】16時間後、プロトコール全体で使用され、ハウス真空源に取り付けられた24-チャンネルワンド (V&P Scientific) を用いて各ウェルから培地を吸引した。全てのその後の液体の添加段階に使用されるMultidrop 384プレートフィーラー (Labsystems) を用いて、50  $\mu$ Lの70%エタノール/30%リン酸緩衝食塩水 (4°C) を各ウェルに添加した。室温においてプレートを1時間インキュベーションし、次いでウェルを吸引し、0.5% Tween 20を含有する2M HCl 25  $\mu$ Lを各ウェルに添加した。プレートを室温において20分間インキュベーションした。次いで、25マイクロリッターの2M NaOHを各ウェルに添加した。各ウェルの液体を吸引し、ウェルを75  $\mu$ Lのハンクスの平衡塩類溶液で2回洗浄した。ウェルを75  $\mu$ LのPBSTM (0.5%ウシ血清アルブミンおよび0.1% Tween 20を含有するリン酸緩衝食塩水) で再度洗浄した。20マイクロリッターの抗体溶液を各ウェル (0.5  $\mu$ g/mLの抗BrdU抗体 (Pha

rmMingen) および2000倍希釈の抗マウスIg-HRP (Amersham) を含有する) に添加した。プレートを抗体溶液とともに室温において1時間インキュベーションし、次いで抗体溶液を吸引除去し、各ウェルをリン酸緩衝食塩水で1回洗浄した。最後に、20  $\mu$ LのECL検出試薬を各ウェルに添加した (Amersham's ECL検出試薬の溶液1および溶液2の等量混合物)。各ウェルの発光をLJLアナリストプレートリーダーで、ウェルあたり0.2秒の積算時間を用いて読み取った。2つのプレートにおいて実験を反復し、各対応のある組み合わせを16の反復実験の全てにおいて試験した。表1に示すデータは、化合物の各々の組み合わせの平均抗増殖活性を示す。5つの統計学的に有意な ( $p < 0.001$ ) 組み合わせを強調してある。全ての活性は、いかなる処理も受けていない細胞を含有するウェルのセットに正規化してある。従って、値1は不活性基質であり、1より大きい値は抗増殖活性のレベルを示す。

【0160】

【表1】

	DMSO	ボドフィロトキシ ン	バクリタキセル	キナクリン	ベプリジル	ジピリダモール	プロメタジン	アグロクラビン
DMSO	1.0							
ボドフィロトキシ ン	6.5	6.5						
バクリタキセル	6.3	6.3	7.1					
キナクリン	1.1	6.6	6.9	2.3				
ベプリジル	1.8	15.2	3.1	3.0	14.4			
ジピリダモール	1.5	8.9	8.8	2.3	2.4	2.0		
プロメタジン	1.3	3.9	6.4	2.4	15.2	1.8	4.8	
アグロクラビン	1.0	5.7	5.8	1.6	1.9	1.5	1.2	1.0

チャートは、個々の構成要素とは別個の、抗増殖活性を有する既存のFDA承認薬の5つの組み合わせを示す。ボドフィロトキシおよびバクリタキセルは共に、細胞を有糸分裂状態で停止させる微小管安定剤であり、ジピリダモールは抗血小板剤であり、ベプリジルはカルシウムチャネル遮断剤であり、プロメタジンはH1ヒスタミン受容体アンタゴニストであってCNS抑制剤および抗コリン作動薬としても使用される。ジピリダモールは、一般に、特に、バクリタキセルおよびボドフィロトキシンの毒性の副作用と比較した場合に、ヒトに対する治療薬として比較的安全性の高いプロフィールを有すると考えられている。従って、このアッセイ法において、ジピリダモールはバクリタキセルおよびボドフィロトキシンのヒト肺癌細胞に対する抗増殖作用を増強する。さらに、ベプリジはボドフィロトキシンの作用を増強するが、バクリタキセルの作用を阻害する。この結果は、従来には予測されておらず、薬剤間の予期されない相互作用を観察する

ための組み合わせの実験的高スループット試験の重要性を強調している。例えば、ベプリジルおよびプロメタジンは、どちらも現在の治療薬の適応では抗増殖薬として使用されていないが、組み合わせると、肺癌細胞の増殖を強力に阻止する。

【0161】他の態様

上記の明細書に記載した全ての刊行物および特許は参照として本明細書に組み入れられている。本発明の範囲および精神から逸脱することなく、記載されている本発明の方法およびシステムの種々の改良および変更を加えることができることは当業者に明らかである。本発明は具体的な好ましい態様に関連して記載されているが、主張されている本発明はこのような具体的な態様に不用意に限定されるべきではないことが理解されるべきである。実際、薬剤発見分野または関連する分野の当業者に明らかである本発明を実施するための記載されている様式の種々の改良は本発明の範囲内であることが意図されてい

る。

#### 【0162】

【発明の効果】本発明の高スループットスクリーニング方法は、製薬産業で使用される従来の薬剤発見方法の迅速で、強力な別法となる。本発明は、例えば低分子（そのいくつかは新規に合成してもよく、またはそのいくつかは既知のFDA承認済み薬剤であってもよい）の以前には知られていなかった治療的に強力な組み合わせを同定することができる。効果的な組み合わせが、全てがすでにFDAの承認を得ている2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の薬剤によってのみより作製される場合には、新たな組み合わせは、FDA承認過程を介して容易に移動するさらなる利点を有する。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 試薬が同一の細胞内の異なる標的に結合する場合に、細胞の内部で2つの異なる試薬が相乗的にどのように作用するかを示す概念図である。

【図2】 試薬が異なる細胞または組織内の標的に結合する場合に、生物の内部で2つの異なる試薬が相乗的にどのように作用するかを示す概念図である。

【図3】 本明細書に記載される種類のコンビナトリアルスクリーニングにおいて得られる実験データの例である。5つの異なる384ウェルプレートの結果のうちプレート1の結果を示す。結果は、A~Pまでラベルした16列および1~24までラベルした24カラムからなるプレート様式で示す。活性レベルは各ウェルにおいて数で示し、1は基底状態の活性（作用なし）を意味し、5は活性の組み合わせが見られることを意味する。

【図4】 本明細書に記載される種類のコンビナトリアルスクリーニングにおいて得られる実験データの例である。5つの異なる384ウェルプレートの結果のうちプレート2の結果を示す。結果は、A~Pまでラベルした16列および1~24までラベルした24カラムからなるプレート様式で示す。活性レベルは各ウェルにおいて数で示し、1は基底状態の活性（作用なし）を意味し、5は活性の組み合わせが見られることを意味する。

【図5】 本明細書に記載される種類のコンビナトリア

ルスクリーニングにおいて得られる実験データの例である。5つの異なる384ウェルプレートの結果のうちプレート3の結果を示す。結果は、A~Pまでラベルした16列および1~24までラベルした24カラムからなるプレート様式で示す。活性レベルは各ウェルにおいて数で示し、1は基底状態の活性（作用なし）を意味し、5は活性の組み合わせが見られることを意味する。

【図6】 本明細書に記載される種類のコンビナトリアルスクリーニングにおいて得られる実験データの例である。5つの異なる384ウェルプレートの結果のうちプレート4の結果を示す。結果は、A~Pまでラベルした16列および1~24までラベルした24カラムからなるプレート様式で示す。活性レベルは各ウェルにおいて数で示し、1は基底状態の活性（作用なし）を意味し、5は活性の組み合わせが見られることを意味する。

【図7】 本明細書に記載される種類のコンビナトリアルスクリーニングにおいて得られる実験データの例である。5つの異なる384ウェルプレートの結果のうちプレート5の結果を示す。結果は、A~Pまでラベルした16列および1~24までラベルした24カラムからなるプレート様式で示す。活性レベルは各ウェルにおいて数で示し、1は基底状態の活性（作用なし）を意味し、5は活性の組み合わせが見られることを意味する。

【図8】 現在市販されている入手可能な技術を使用し、コンビナトリアルスクリーニングを実施する方法の線図である。

#### 【符号の説明】

10 化合物A、12 化合物B、16 タンパク質X、18 転写因子Y、20 転写因子Z、14 原形質膜、50 化合物A、52  $\beta$ 島細胞、54 脾臓、56 インスリン、58 脂肪細胞、60 脂肪組織、62 インスリン受容体、100 アッセイプレート、110 マルチドロップ384プレートリーダー、120 5%CO<sub>2</sub>による37°Cインキュベーター、130 ピンアレイ (Matrix Technologies Pin Transfer 装置)、140 貯蔵プレート、150 貯蔵プレート、160 LJLアナリストADプレートリーダー。





【図6】

プレート 4

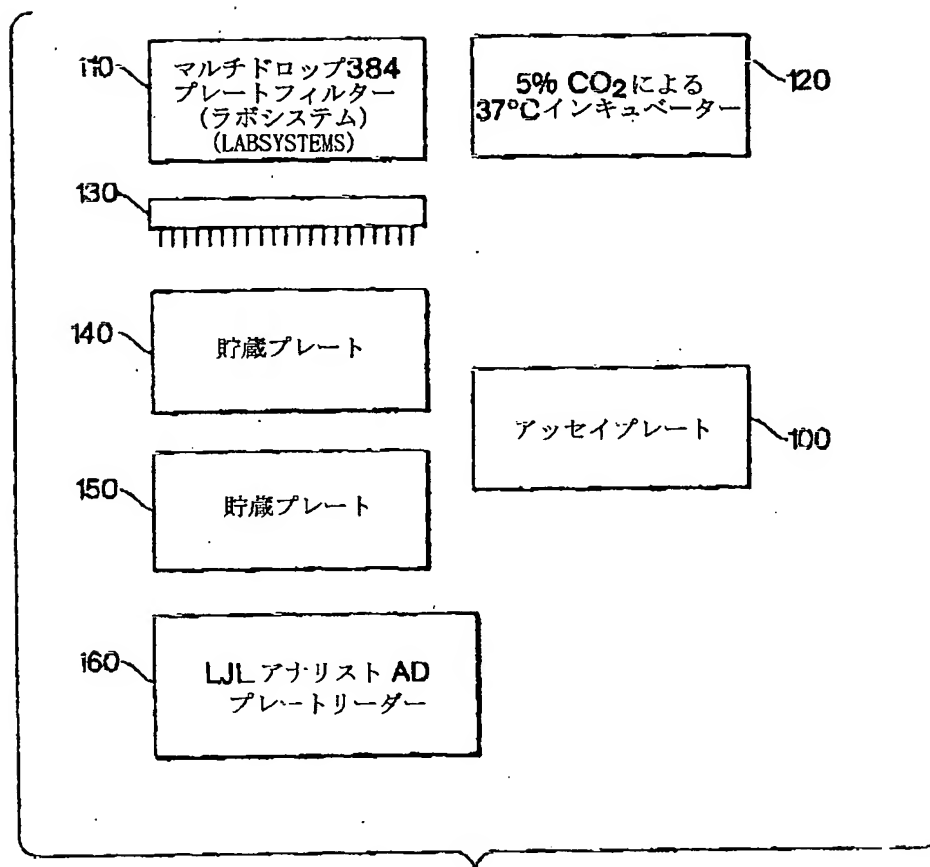
[illegible]

【図7】

プレート 5

[illegible]

【図8】



【手続補正書】

【提出日】平成14年7月18日(2002. 7. 18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

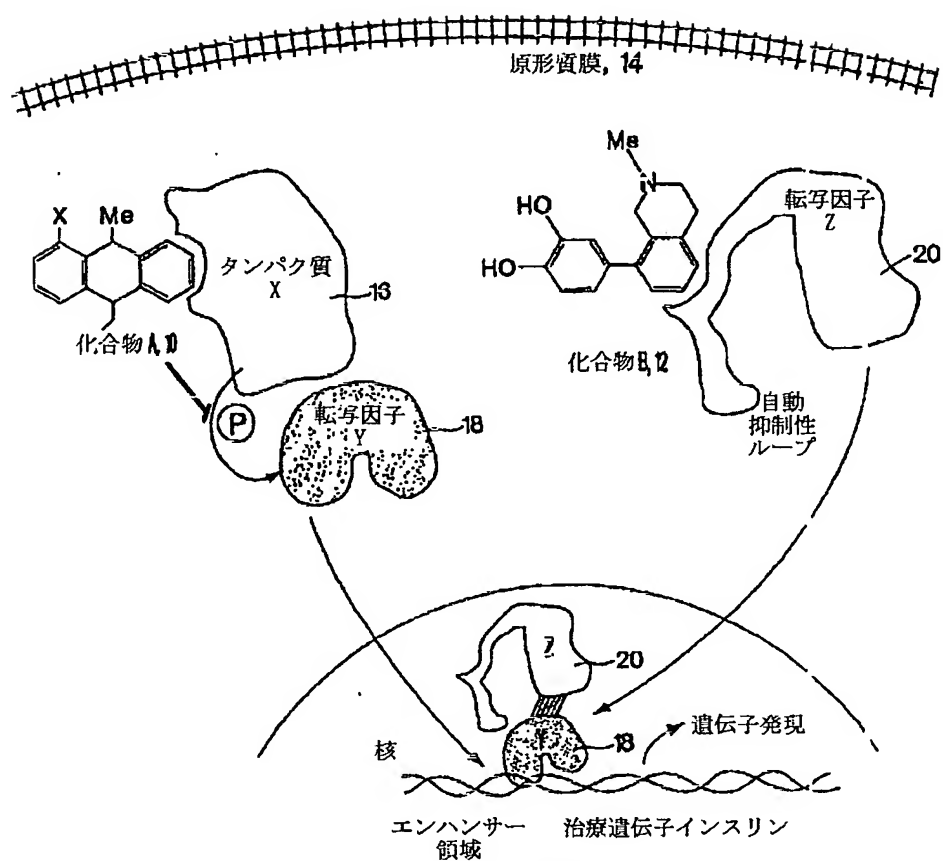
【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】





【手続補正2】

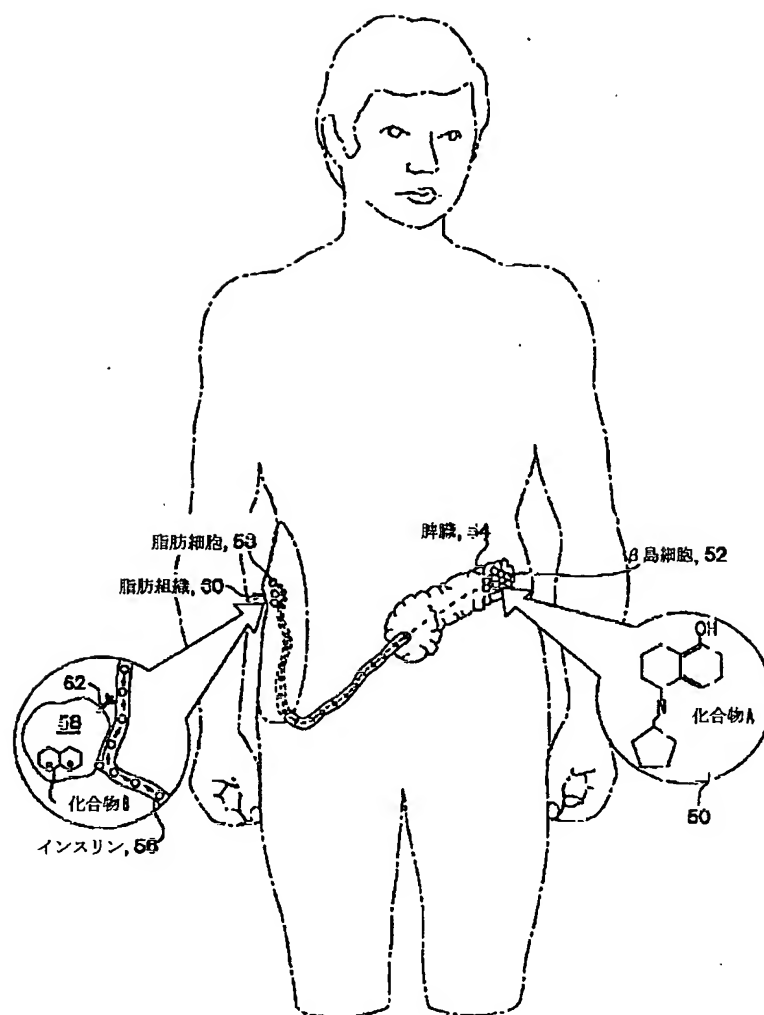
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

【補正内容】

【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	(参考)
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	Z
33/53		33/53	D
			M
33/58		33/58	A
37/00	1 0 2	37/00	1 0 2
	1 0 3		1 0 3
// G 0 1 N 21/64		21/64	E
			F

(72)発明者 ブレント アール. スtockウェル  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ  
ストン アパートメント #4 ウエスト  
シダー ストリート 59

(72)発明者 マイケル エー. フォリー  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 チ  
ェストナット ヒル ウォルコット ロー  
ド 93

(72)発明者 アレクシス ボリシー  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ  
ストン アパートメント #2 リベル  
ストリート 31

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 DA02 EA01 FA02  
GA25 GB21 KA02 KA05  
2G045 AA40 BB20 CB01 DA12 DA13  
DA14 DA30 DA36 DA60 DA80  
DB00 FA11 FA16 FB02 FB03  
FB07 FB12 GC15 GC22 HA16  
4B063 QA01 QQ05 QR68 QS24 QS31  
QS40  
4C084 AA17 NA14 ZB262